



Rui Pedro Gonçalves Pinheiro Osório

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

**Estudo da influência na bioactividade da
adição de materiais piezoeléctricos
(BaTiO₃) a hidroxiapatite para implantes
ósseos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Maria do Carmo Lança, Doutora, UNL/FCT
Co-orientador: João Paulo Borges, Doutor, UNL/FCT

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca
Arguente: Prof. Doutor Jorge Alexandre Monteiro Carvalho Silva
Vogal: Prof. Doutora Maria do Carmo Henriques Lança
Vogal: Prof. Doutor João Paulo Borges

Outubro de 2012



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



Rui Pedro Gonçalves Pinheiro Osório

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

**Estudo da influência na bioactividade da
adição de materiais piezoeléctricos
(BaTiO₃) a hidroxiapatite para implantes
ósseos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Maria do Carmo Lança, Doutora, UNL/FCT

Co-orientador: João Paulo Borges, Doutor, UNL/FCT

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca
Arguente: Prof. Doutor Jorge Alexandre Monteiro Carvalho Silva
Vogal: Prof. Doutora Maria do Carmo Henriques Lança
Vogal: Prof. Doutor João Paulo Borges

Outubro de 2012



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Estudo da influência na bioactividade da adição de materiais piezoeléctricos (BaTiO_3) a hidroxiapatite para implantes ósseos

Copyright © 2012 – Rui Pedro Gonçalves Pinheiro Osório, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Todos os direitos reservados. All rights reserved.

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor”.

Agradecimentos

Muitos foram os contributos directos e indirectos de várias pessoas e instituições que possibilitaram a realização deste estudo. Sendo esse auxílio de diversas índoles, frequências e intensidades e mesmo correndo o risco de poder esquecer ou indiferenciar alguém – a quem antecipadamente peço desculpa - não posso deixar de agradecer a ajuda recebida por parte de alguns colegas e amigos.

Gostaria de agradecer à professora doutora Maria do Carmo Lança e ao professor doutor João Paulo Borges o acompanhamento dado e a oportunidade de trabalhar com excelentes profissionais num tema tão interessante e estimulante como o do presente trabalho.

Um especial agradecimento aos meus colegas de laboratório Janeca e Eugen.

Agradecimento ao departamento de materiais da FCT/UNL assim como ao CENIMAT/I3N pela sua disponibilidade de material e pessoal.

Agradecer ainda aos meus pais e irmã que me aturaram nos momentos mais difíceis, são eles que mais sabem das “aventuras” da tese.

Aproveito também esta ocasião para pedir desculpa à Verinha e ao Rui pelo adiar da vossa chegada.

Resumo

Nas últimas décadas, tem-se assistido a um aumento da utilização de implantes médicos, nomeadamente de carácter ortopédico, cardíaco, dentário, entre outros. Por este mesmo facto, urge a necessidade do desenvolvimento de materiais passíveis de utilização para este efeito.

No que à área de implantes ósseos diz respeito, a Hidroxiapatite e o Titanato de Bário, são dois materiais que se têm revelado bastante promissores, nomeadamente pelas suas características de biocompatibilidade e bioactividade. O presente trabalho, incidiu no estudo destes dois materiais, mais especificamente na produção de um composto, e no efeito da polarização eléctrica na sua bioactividade.

Inicialmente foram adquiridos pós de Titanato de Bário de dimensão inferior a $2\mu\text{m}$ e sintetizados pós de Hidroxiapatite através do método Sol-Gel e a partir duma mistura destes pós, foram formadas pastilhas por prensagem de 1,3cm de diâmetro e 0,05cm de espessura.

Posteriormente, procedeu-se à caracterização dos pós e pastilhas em termos morfológicos, estruturais, eléctricos e dieléctricos. O passo seguinte consistiu na realização de testes de bioactividade a 37°C numa solução simuladora de fluido corporal (SBF), tendo-se utilizado amostras de controlo (não polarizadas) e pastilhas de teste (polarizadas a 200°C durante 1h, sob acção de um campo eléctrico DC de 10KV/cm), estes testes foram realizados durante 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 1 semana e 2 semanas.

Decorridos os testes de bioactividade, as pastilhas foram analisadas por SEM/EDS, tendo-se simultaneamente realizado medições de espectroscopia U.V. às soluções de SBF, para determinar as concentrações de Ca^{2+} e de PO_4^{3-} e para verificar a deposição de apatites.

Palavras-chave: hidroxiapatite; titanato de bário, polarização eléctrica; bioactividade.

Abstract

In recent decades there has been an increased use of medical implants, particularly in terms of orthopedic, cardiac, dental, among others. By this very fact, there is an urgent need for the development of materials liable to use for this purpose.

In the field of bone implants, hydroxyapatite and barium titanate are two materials that have proved promising, namely for their biocompatibility and bioactivity. This work focused on studying these two materials, specifically in the production of a composite, and the effect of the electrical polarization in its bioactivity.

Initially barium titanate powders of size inferior to $2\mu\text{m}$ were purchased and Hydroxyapatite powders synthesized by the method Sol-Gel. From a mixture of these two powders, samples of 1.3 cm diameter and 0.05 cm thickness were formed by compression.

Thereafter, we proceeded to characterize the powders and samples morphologically, structurally, electrically and dielectrically. The next step consisted in the realization of bioactivity tests at 37°C in a solution of simulated body fluid (SBF). Control samples (non-polarized) and test samples (polarized at 200°C for 1h, under action a DC electric field of $10\text{KV}/\text{cm}$) were used. These tests were performed for the duration of 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 1 week and 2 weeks.

Undergone the bioactivity tests, the tablets were analysed by SEM / EDS, and simultaneously measurements of UV spectroscopy were performed to the SBF solutions in order to determine the concentration of Ca^{2+} and PO_4^{3-} and to check the precipitation of apatites.

Keywords: hydroxyapatite; barium titanate; electrical polarization ; bioactivity.

Índice de Matérias

Agradecimentos.....	ii
Resumo	iii
Abstract.....	v
Índice de Matérias	vii
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xv
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xvii
I-Introdução	1
1.1-Importância do tema	3
1.2-Estrutura do trabalho	4
II- Enquadramento Teórico.....	5
2.1- Materiais para enxertos ósseos.....	7
2.2- Interação dos materiais implantados com o organismo e tecidos ósseos circundantes.....	8
2.3- Efeito piezoeléctrico.....	10
2.3.1- Piezoelectricidade do osso	11
2.4- Hidroxiapatite	12
2.4.1- Polarização da Hidroxiapatite	13
2.5- Titanato de Bário (BT)	14
2.6- Estado de arte da interação da HAp e do BT com o organismo/tecido ósseo.....	16
2.6.1- Resposta <i>IN VITRO</i>	16
2.6.1.1- HAp.....	16
2.6.1.2- BT	17
2.6.1.3-Misturas de HAp com BT (HABT)	18
2.6.2-Resposta <i>IN VIVO</i>	19
2.6.2.1- HAp.....	19
2.6.2.2- BT	20
2.6.2.3-HABT	21
2.6.3-Resumo da revisão bibliográfica efectuada	21
2.7- Mecanismos de interação biológica da HAp e do BT	24
2.7.1- Modelos de interação biológica do BT	24
2.7.2- 2 Modelos de interação biológica da HAp	25
1	25
2	26
2.8- Método Sol-Gel.....	27
2.8.1-Vantagens e Desvantagens do método Sol-Gel.....	28

2.8.1.1-Vantagens	28
2.8.1.2-Desvantagens.....	29
2.8.2-Etapas do método Sol-Gel.....	29
2.8.2.1-Formação da solução inicial ou Sol	30
2.8.2.2-Formação do Gel.....	30
2.8.2.3-Envelhecimento.....	30
2.8.2.4-Secagem	31
2.8.2.5-Sinterização ou Densificação	31
III- Objectivos.....	33
IV- Metodologia	37
4.1- Técnicas de caracterização/preparação das amostras.....	39
4.1.1- Difracção por Raios-X.....	39
4.1.2- Espectroscopia de Infra-Vermelhos por transformada de Fourier.....	40
4.1.3- Dispersão de pós por ultra-sons	41
4.1.4- Microscopia electrónica de varrimento (SEM)	42
4.1.5- Corrente de carga/descarga isotérmica (ICC/IDC)	43
4.1.6- Corrente de descarga termicamente estimulada (TSDC)	44
4.1.7- Espectroscopia no Ultra-Violeta/Visível.....	46
4.1.8- Espectroscopia de relaxação dieléctrica (DRS)	47
4.2- Procedimento experimental.....	49
4.2.1- Síntese das amostras	50
4.2.1.1- Síntese de pós de HAp pelo método Sol-Gel	50
4.2.1.2- Dispersão de pós por ultra-sons	51
4.2.1.3- Produção de pastilhas (amostras)	51
4.2.2- DRX.....	52
4.2.3- FTIR	52
4.3.4- SEM/EDS	53
4.3.5- ICC/IDC	53
4.3.6- TSDC	53
4.3.7- Síntese do SBF	54
4.3.8- Ensaio de bioactividade	55
4.3.9- Espectroscopia no U.V./Visível.....	56
4.3.10- DRS.....	56
V-Apresentação/discussão dos resultados experimentais.....	57
5.1- DRX	59
5.2- FTIR.....	64
5.3- ICC/IDC	66
5.3.1- Carga/Descarga a 80°C.....	67
5.3.2- Carga/Descarga a 120°C.....	70
5.4- TSDC	74
5.5- SEM/EDS.....	82
5.6- Espectroscopia no U.V./Visível	91

5.7- DRS	96
VI-Conclusões e perspectivas futuras.....	101
Bibliografia	101

Índice de Figuras

Figura II.1- Representação esquemática do comportamento piezoelétrico. (a,b)- Efeito Directo; (c,d)- Efeito indirecto [11].	10
Figura II.2- Representação esquemática da estrutura da HAp [19].	12
Figura II.3- Representação da estrutura cúbica e tetragonal da célula unitária de BT. Adaptado de [19].	15
Figura II.4- Esquema representativo da interacção de BT polarizado imerso em SBF. Adaptado de [32].	24
Figura II.5- Esquema representativo da interacção de HAp imersa em SBF [44].	25
Figura II.6- Esquema representativo da interacção de HAp polarizada no organismo [17].	26
Figura II.7- Esquema representativo do método sol-gel. Adaptado de Chemat Technology [49]	29
Figura IV.1- Esquema representativo dos campos eléctricos aplicados e respectivos tempos (vermelho). Espectro típico dum ICC/IDC (tracejado azul).	44
Figura IV.2- A- Esquema representativo do campo eléctrico DC aplicado (vermelho), respectivos tempos e variações de temperatura (azul). B-Espectro típico dum ICC/IDC (tracejado azul).	46
Figura IV. 3- Esquema resumo representativo do procedimento experimental.	49
Figura IV. 4- Esquema explicativo das medições de DRX efectuadas às amostras.	52
Figura V. 1- Difractograma obtido para uma pastilha de HAp utilizando os pós obtidos através do método sol-gel, para diferentes temperaturas.	59
Figura V. 2- Informação relativa à HAp detectada	59
Figura V. 3- Difractograma obtido para uma pastilha de BT, utilizando os pós adquiridos comercialmente para diferentes temperaturas.	61
Figura V. 4- Informação relativa ao BT detectado	62
Figura V. 5- Difractograma obtido para a pastilha 20HABT para diferentes temperaturas.	62
Figura V. 6 - Espectro de FTIR obtido para pastilhas contendo pós de HAp, de BT e combinação de ambos.	64
Figura V. 7 – Ampliação do espectro anterior de FTIR na zona de interesse para a identificação das ligações presentes nos dois compostos.	64
Figura V. 8- Gráfico obtido através da medição de correntes de carga e descargas isotérmicas (ICC/IDC) de uma amostra de Hap e outra de 20HABT sujeitas a um campo eléctrico DC de 4 KV/cm a 80°C por 1h.	66
Figura V. 9- Gráficos obtidos através da medição de correntes de carga isotérmicas (ICC), medidas em atmosfera de ar, a 80°C, para as 3 amostras em estudo, sujeitas a um campo eléctrico DC de 4kV/cm (A); 10kV/cm (B); e 20kV/cm (C) de intensidade.	67
Figura V. 10- Gráficos obtidos através da medição de correntes de descarga isotérmicas (IDC), medidas em atmosfera de ar, a 80°C, para as 3 amostras em estudo, após terem sido sujeitas a um campo eléctrico DC de 4kV/cm (A); 10kV/cm (B); e 20kV/cm (C) de intensidade.	69

Figura V. 11- Gráficos obtidos através da medição de correntes de carga isotérmicas (ICC), medidas em atmosfera de ar, a 120°C, para as 3 amostras em estudo, sujeitas a um campo eléctrico DC de 4KV/cm (A); 10KV/cm (B); e 20KV/cm (C) de intensidade.	70
Figura V. 12- Gráficos obtidos através da medição correntes de descarga isotérmicas (IDC), medidas em atmosfera de ar, a 120°C, para as 3 amostras em estudo, após terem sido sujeitas a um campo eléctrico DC de 4KV/cm (A), 10KV/cm (B) e 20KV/cm (C) de intensidade.	72
Figura V. 13- Aquecimento das amostras HAp, 5HABT, 10HABT, 15HABT, 20HABT a 2C°/m da temperatura ambiente até 523.15K (250°C).....	74
Figura V. 14- TSDC para amostras de HAp, 5HABT, 10HABT, 15HABT, 20HABT, aquecidas a 5°C/m até 473.15K, onde ficaram durante 1h, tendo sido polarizadas a esta mesma temperatura durante 1h sob a acção de um campo eléctrico de 10kV/cm, com $t_0=2h$	75
Figura V. 15- Aquecimento das amostras HAp, 5HABT, 10HABT, 15HABT, 20HABT a 2C°/m da temperatura ambiente até 523.15K (250°C), após tratamento 24h a 403.15K (130°C) + 24h no exsiccador.....	76
Figura V. 16- TSDC para amostras de HAp, 5HABT, 10HABT, 15HABT, 20HABT, aquecidas a 5°C/m até 473.15K, onde ficaram durante 1h, tendo sido polarizadas a esta mesma temperatura durante 1h sob a acção de um campo eléctrico de 10KV/cm, com $t_0=2h$	77
Figura V. 17- TSDC obtido para uma amostra de HAp uma semana após esta ter sido aquecida a 5°C/m até 473.15K (200°C), onde ficou durante 1h, tendo sido polarizadas a esta mesma temperatura durante 1h sob a acção de um campo eléctrico de 10KV/cm, com $t_0=2h$. Durante o período de armazenamento de uma semana, a amostra de HAp foi colocada em estufa a 310.15K (37°C).....	80
Figura V. 18- Imagens de SEM dos pós de HAp sintetizados através do método Sol-Gel, com diferentes ampliações.	82
Figura V. 19- Imagens de SEM a diferentes ampliações, de uma pastilha de HAp produzida pela prensagem de pó de HAp produzido pelo método Sol-Gel.	83
Figura V. 20- Imagens de SEM de pastilhas de 20HABT, com mistura mecânica dos pós. (A):Electrões Secundários; (B):Electrões retrodifundidos.....	84
Figura V. 21- Imagens de SEM de pastilhas de 20HABT, com mistura ultra-sónica dos pós. (A): Electrões Secundários; (B): Electrões retrodifundidos.....	84
Figura V. 22- A- Espectro de EDS obtido para uma pastilha de HAp. B- face negativa de uma pastilha polarizada imersa em SBF por 12h.	85
Figura V. 23- Imagens de SEM para amostras de HAp polarizadas, imersas em SBF durante 1 semana. (A,C)- Face negativa da amostra; (B,D)- Face positiva da amostra	86
Figura V. 24- Imagens de SEM de uma mesma amostra imersa em SBF durante 1 semana. A,B- Correspondem a partes distintas duma mesma face da mesma amostra. C,D- Correspondem respectivamente à ampliação das imagens A e B.	87
Figura V. 25- Imagem de uma secção de corte da face negativa em SEM de uma amostra de 20HABT com imersão de 3h em SBF.....	88
Figura V. 26- Imagem de SEM da face positiva de uma amostra de HAp imersa em SBF durante 1 semana.....	88
Figura V. 27- Imagem de SEM da face negativa de uma amostra de HAp imersa em SBF durante 1 semana.....	89
Figura V. 28- Imagem de SEM de uma amostra 10HABT, face negativa,3h imersa em SBF.A- Electrões retrodifundidos. B- Electrões Secundários	90

Figura V. 29- Diagramas das concentrações de Cálcio, em mM, presentes nas soluções de SBF, onde as amostras de HAp- (A,B); 5HABT- (C,D); 20HABT- (E,F), de controlo e polarizadas, estiveram imersas no decorrer dos testes de bioactividade.....	92
Figura V. 30- Diagramas das concentrações de Fósforo, em mM, presente nas soluções de SBF, onde as amostras de HAp (A,B), 5HABT(C,D) e 20HABT(E,F), de controlo e polarizadas, estiveram imersas no decorrer dos testes de bioactividade.....	93
Figura V. 31 – Resposta em frequência da permitividade de um material [74].....	96
Figura V. 32- Espectros de DRS da primeira e da segunda run relativos à componente real (ϵ') e à componente imaginária (ϵ'') da permitividade em função da frequência (f) e da temperatura (T), obtidos em atmosfera de ar para uma amostra de HAp.	98
Figura V. 33- Espectros de DRS da primeira e da segunda run relativos à componente real (ϵ') e à componente imaginária (ϵ'') da permitividade em função da frequência (f) e da temperatura (T), obtidos em atmosfera de ar para uma amostra de 10HABT.....	99
Figura V. 34- Espectros de DRS da primeira e da segunda run relativos à componente real (ϵ') e à componente imaginária (ϵ'') da permitividade em função da frequência (f) e da temperatura (T), obtidos em atmosfera de ar para uma amostra de 20HABT.....	100

Índice de Tabelas

Tabela IV. 1- Categorias de ultra-sons.....	41
Tabela IV. 2- Tabela com os parâmetros utilizados durante o processo de sonificação da mistura a homogeneizar.....	51
Tabela IV. 3- Concentrações iónicas, em mM e pH da solução SBF e do plasma sanguíneo. Adaptado de Tas et al, (2000) [56].	54
Tabela V. 1- Medições da dimensão do cristalito a 30°C antes e após aquecimento até aos 220°C.	60
Tabela V. 2- Medições da dimensão do cristalito depois de 30m à temperatura de 220°C, assim como aos 30°C antes e após o referido aquecimento.....	62
Tabela V. 3- Total de densidade de corrente medida na 1ª run de aquecimento para as amostras com e sem tratamento térmico prévio.	78
Tabela V. 4- Medições relativas à despolarização de amostras com e sem tratamento térmico prévio.....	79
Tabela V. 5- Efeito das condições de polarização numa amostra de HAp uma semana após esta ter sido aquecida a 5°C/m até 473.15K (200°C), onde ficou durante 1h, tendo sido polarizadas a esta mesma temperatura durante 1h sob a acção de um campo eléctrico de 10KV/cm, com $t_0=2h$. Durante o período de armazenamento de uma semana, a amostra de HAp foi colocada em estufa a 310.15K (37°C).....	80

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

σ - Condutividade	IDC- Isothermal discharging current
ω - Frequência angular	MEM- Modified Eagle's Medium
σ' - Componente real da condutividade	MWS- Maxwell-Wagner-Sillars
σ'' - Componente imaginária da condutividade	Q_p - Carga de polarização
AC- Alternating current	RMN- Ressonância magnética nuclear
BT- Titanato de Bário	SBF- Simulated body fluid
c.d.o- comprimento de onda	SEM- Scanning electron microscope
CaP- Fosfato de Cálcio	T_0 - Temperatura ambiente
DC- Direct Current	t_0 - tempo de espera desde a remoção do campo eléctrico DC aplicado e o início da medição das correntes termoestimuladas
Dc- Dimensão do cristalito	t_c - tempo de carga
DRS- Dielectrical Relaxation Spectroscopy	T_c - Temperatura de Curie
DRX- X-Ray diffraction	TCP- Fosfato tricálcico
E_0 - Sem campo eléctrico DC aplicado	tde- tempo de descarga
E_a - Energia de activação	T_p - Temperatura de polarização
EDS- Energy Dispersive X-Ray	t_p - tempo de polarização
E_p - Campo electric DC de polarização	TSDC- Thermally Stimulated Depolarization Current
FTIR- Fourier Transform Infrared Spectroscopy	U.V.- Ultra-violeta
HABT- Mistura de Hidroxiapatite com Titanato de Bário	ϵ - Permitividade
HAp- Hidroxiapatite	ϵ' - Componente real da permitividade
I_0 - Corrente nula	ϵ'' - Componente imaginária da permitividade
ICC- Isothermal charging current	τ - Tempo de relaxação
ICSD: Inorganic Crystal Structure Database	

I-Introdução

1.1-Importância do tema

1.2-Estrutura do trabalho

1.1-Importância do tema

Nas últimas décadas tem-se verificado um aumento bastante acentuado na utilização de implantes médicos. Entre múltiplas aplicações destacam-se os implantes de carácter ortopédico, cardíaco e dentário.

Face a esta nova realidade, foi elaborado em 2003 um relatório sobre as necessidades de implantes médicos por parte da população norte-americana, tendo-se estimado a existência de um mercado para este tipo de material na ordem de 39 mil milhões USD [1]. Aliado a esta já presente realidade, o progressivo envelhecimento da população nos países mais desenvolvidos, com a consequente degradação “natural” da qualidade de vida, sugere um aumento sustentado da necessidade da existência de técnicas/materiais que sejam capazes de minimizar este efeito.

Para lidar com esta cada vez mais presente necessidade, nomeadamente para as situações em que o tratamento farmacológico não é suficiente, recorre-se usualmente a transplantes de tecidos e órgãos a partir de outras pessoas (transplante alogénico), do próprio indivíduo (transplante autogénico) ou mesmo de animais (transplante xenogénico). Associado a este tipo de procedimentos, existem diversas limitações de ordem técnica, logística e moral. Seja pela escassez de dadores, agravada por questões de incompatibilidade ou até por complicações associadas ao próprio processo de transplantação no dador, urge então a necessidade da procura de alternativas viáveis, nomeadamente pela pesquisa e desenvolvimento de materiais capazes de mimetizar as funções e características dos órgãos e tecidos humanos.

Hoje em dia, em certos campos específicos da medicina existem já implantes capazes de executar até certo ponto estas funções, proporcionando às pessoas que delas necessitam uma considerável melhoria da qualidade de vida. No entanto, e apesar do anteriormente referido, esta não é ainda uma realidade democratizada a níveis considerados ideais, nem tão pouco possível em muitas das co-morbilidades existentes. Pelos motivos expostos anteriormente, associados a um recente forte desenvolvimento no que à biotecnologia diz respeito, a área de implantologia surge actualmente como uma das mais promissoras no campo médico.

Na área da implantologia ortopédica, a actual orientação incide no restabelecimento integral do sistema músculo-esquelético ou na aceleração do processo natural de regeneração óssea, recorrendo-se para tal a um vasto leque de técnicas e de materiais disponíveis. Neste campo, a utilização de enxertos ósseos é utilizada para o tratamento de pequenas/médias perdas de tecido ósseo e/ou aceleração do processo de regeneração [2].

1.2-Estrutura do trabalho

O presente trabalho surge no âmbito de um trabalho de investigação a realizar no Departamento de Ciência dos Materiais da FCT/UNL.

Por facilidade de abordagem, optou-se por estruturar o presente documento em 6 capítulos e respectiva bibliografia. A sua organização respeita uma lógica sequencial onde é referida a importância do tema, revisão de literatura relacionada, são definidos os objectivos do estudo de investigação, apresenta-se a metodologia utilizada, os resultados obtidos, as conclusões onde se resumem as ilações mais importantes do projecto de investigação e por último possíveis perspectivas futuras de investigação. Vejamos então de uma forma mais detalhada quais as temáticas abordadas em cada um destes capítulos.

Após a Introdução, no capítulo relativo ao Enquadramento Teórico, pretende-se esclarecer alguns conceitos considerados relevantes, descrever os materiais a utilizar e o estado de arte da temática em estudo.

No capítulo referente aos Objectivos são estabelecidos os objectivos gerais e específicos de investigação. Na sua interpretação deverá ter-se em particular consideração a importância do tema e o enquadramento teórico efectuado nos capítulos anteriores.

No capítulo referente à Metodologia, são descritas as principais técnicas de caracterização utilizadas na realização do trabalho e respectiva operacionalização.

No capítulo seguinte de Apresentação/discussão dos resultados experimentais, são apresentados e discutidos os resultados. A organização deste capítulo respeita os objectivos e as fases do trabalho desenvolvido. São detalhados alguns dos resultados alcançados e abordados para discussão os aspectos considerados mais relevantes.

No capítulo das Conclusões e perspectivas futuras, são sintetizados os resultados mais significativos e respectivas implicações, sendo igualmente descritas algumas das perspectivas futuras de investigação directamente relacionadas com a temática em estudo.

Por último são referenciadas todas as fontes bibliográficas consultadas para o trabalho.

II- Enquadramento Teórico

2.1- Materiais para enxertos ósseos

2.2- Interacção dos materiais implantados com o organismo e tecidos ósseos circundantes

2.3- Efeito piezoeléctrico

2.4- Hidroxiapatite

2.5- Titanato de bário

2.6- Estado de arte da interacção da HAp e do BT com o organismo/tecido ósseo

2.7- Mecanismos de interacção biológica da HAp e do BT

2.8- Método Sol-Gel

2.1- Materiais para enxertos ósseos

Vários tipos de materiais sintéticos têm sido utilizados para enxertos ósseos, nomeadamente:

1. Metais (tântalo, titânio, ferro ou magnésio) ou ligas metálicas.
2. Polímeros (ácidos poliláctico e poliglicólico e seus co-polímeros, poli(ϵ -caprolactona), poliuretanos).
3. Cerâmicos/Vidros (vidros baseados em sílica, sulfato de cálcio hemihidratado/desidratado ou fosfatos de cálcio)

Do conjunto de diferentes tipos de materiais utilizados, é sobre os fosfatos de cálcio que recaem as maiores expectativas e resultados mais promissores. Devido à sua semelhança físico/química com a componente inorgânica do osso (que representa sensivelmente 60% da sua composição total) este tipo de material foi alvo de interesse de investigação pela primeira vez à 100 anos atrás, tendo sido utilizado para efeitos de enxertos nos últimos 40 anos [3].

No passado, desejava-se que os materiais implantados num organismo fossem bio-inertes. Hoje procuram-se por materiais que sejam bioactivos, capazes de se integrar com moléculas e células existentes no meio e de estimular o crescimento dos tecidos, como é o caso dos bio-cerâmicos cálcio fosfatados. No caso do osso, os materiais a serem implantados devem ser preferencialmente osteoindutores (promover o crescimento de tecido ósseo, através da promoção da diferenciação de células indiferenciadas em osteoblastos, responsáveis pela formação do tecido ósseo), osteocondutores (suportar o crescimento ósseo e adsorver factores de crescimento osteogénico, criando as condições adequadas para permitir a fixação e proliferação de vários tipos de células, bem como a formação de novo osso à sua superfície) e capazes de osteointegração (integrar-se no tecido ósseo existente como no que se forma em seu redor) [4].

2.2- Interacção dos materiais implantados com o organismo e tecidos ósseos circundantes

A interacção entre um implante e os tecidos ósseos circundantes consiste num processo dinâmico, no qual água, iões dissolvidos, biomoléculas e células rodeiam a superfície do implante imediatamente após a sua implantação. Hoje em dia é cientificamente aceite que não existe material estranho ao corpo que seja completamente compatível. As únicas substâncias que se “encaixam” perfeitamente são aquelas sintetizadas pelo próprio corpo (autogénicas) sendo qualquer outra substância reconhecida como estranha, promovendo reacções específicas por parte do organismo. Estas reacções que ocorrem na interface biomaterial/tecido são dependentes do tempo e conduzem a alterações das características do material implantado e dos tecidos circundantes [5,6].

No desenvolvimento de novos biomateriais, é essencial que se compreendam as suas respectivas respostas *in vivo*. Como qualquer outra espécie de material, os biomateriais, mais especificamente os biocerâmicos reagem quimicamente com o meio envolvente, não devendo nestes casos induzir uma mudança que provoque reacções indesejáveis na sua vizinhança ou noutra qualquer parte do organismo.

Genericamente, quando em contacto com materiais artificiais/estranhos ao organismo, este irá interagir de forma distinta consoante a localização específica e o material em causa. Materiais esses, que de acordo com a reacção desencadeada podem ser [7]:

1. Tóxicos- Materiais que libertam substâncias para o organismo em concentrações tóxicas e/ou iniciam a formação de antigénios capazes de provocar uma reacção imunitária por parte dos mesmos.
2. Bioinertes, Biotolerados- Materiais que não libertam qualquer substância tóxica mas também não evidenciam uma resposta positiva por parte do tecido vivo. Geralmente o corpo responde isolando o material, através da formação de uma camada fibrosa à volta do mesmo.
3. Bioactivos- Materiais que induzem uma determinada resposta, como por exemplos a formação de uma camada superficial de apatite biológica, resultando na formação de uma ligação química directa como osso. Como exemplo de materiais que entram nesta categoria, tem-se a hidroxiapatite (com determinadas características específicas) e titanato de bário.

4. Reabsorvíveis- Materiais que ao longo do tempo são capazes de se dissolver completamente e que permitem a formação de um novo tecido nas irregularidades superficiais do material em questão, mas sem que necessariamente haja uma interface directa com o mesmo. Consequentemente, as funções deste tipo de material são de participação no processo dinâmico de formação e de reabsorção que ocorre por exemplo nos tecidos ósseos. Como exemplo deste tipo de materiais temos o β -fosfato tricálcico.

Em algumas das experiências realizadas *in vivo*, observou-se uma reacção inflamatória após implantação de um biocerâmico do grupo dos fosfatos de cálcio, no entanto esta reacção foi justificada pela incorrecta implementação do referido biocerâmico e não ao material em si [8]. A relação comumente aceite é a de que a utilização de fosfatos de cálcio, com uma razão iónica de Ca/P entre 1 e 1.7 é a ideal para o fabrico de implantes (com diferentes graus de porosidade, de estrutura, dimensão, em pós ou grânulos), são não tóxicos, não provocam infecções nem respostas de rejeição por parte do organismo [9].

Estudos realizados em 1988 permitiram concluir que as cargas existentes nas superfícies dos materiais implantados no organismo influenciam a resposta biológica dos tecidos circundantes, nomeadamente a absorção de proteínas pela superfície do material e consequentemente a migração celular e morfologia. O comportamento celular pode também ser afectado pelas espécies transportadores de cargas, dependendo da sua natureza e do respectivo sinal de carga. Estas conclusões são baseadas em culturas celulares e por imersão de amostras em soluções simuladoras do fluido corporal de variados tipos [10].

2.3- Efeito piezoelétrico

Piezoelectricidade é definida pela capacidade que alguns materiais sólidos (materiais cristalinos sem centro de simetria que tenham também uma distribuição assimétrica de cargas eléctricas) têm de gerar um campo eléctrico como resposta à aplicação de uma força mecânica, ou então a situação contrária, isto é, materiais que quando lhes é aplicado um determinado campo eléctrico externo, sofrem alterações nas suas dimensões [11].

Esta característica dos cristais advém da sua composição físico-química. Nesta tipologia de materiais, a deformação mecânica promove um deslocamento relativo entre os dipolos eléctricos (podem ser devidos a iões ou a assimetrias nas nuvens electrónicas das moléculas) no cristal, e só ocorre quando este não possui centro de simetria, ou seja, os centróides de carga positiva e negativa não coincidem [12].

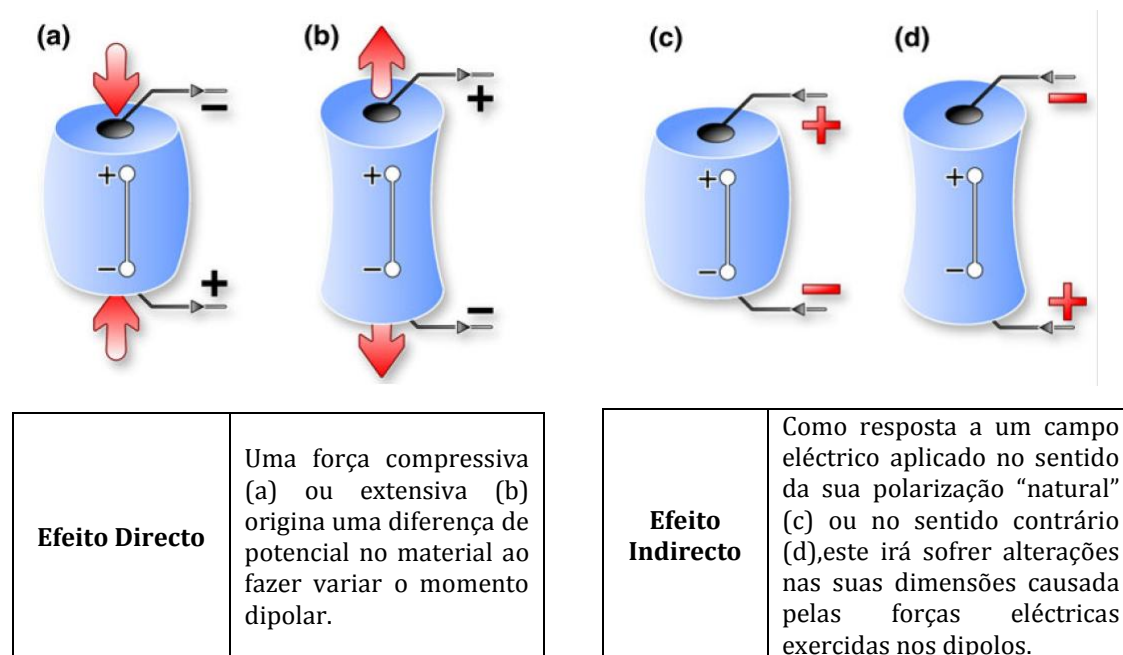


Figura II.1- Representação esquemática do comportamento piezoelétrico. (a,b)- Efeito Directo; (c,d)- Efeito indirecto [11].

2.3.1- Piezoelectricidade do osso

A propriedade piezoelétrica do osso (coeficiente piezoelétrico de 0.2 pC/N) foi inicialmente descoberta por Fukada et al. em 1957 [13], sugerindo que a adição de materiais electricamente activos em implantes ósseos poderia de alguma forma melhorar a adaptação e regeneração dos tecidos. Esta característica resulta das propriedades assimétricas das moléculas de colagénio existente no osso [13] assim como da existência de movimentos de fluidos iónicos no interior do mesmo [14].

Pesquisas iniciais no desenvolvimento de biomateriais para aplicação óssea, incidiam essencialmente na tentativa de se imitar química e fisicamente a estrutura óssea [15]. Mais recentemente surgiu o interesse numa nova geração de biomateriais, capazes de influenciar a regeneração óssea através da reprodução das propriedades eléctricas, nomeadamente pela criação de uma carga positiva/negativa na superfície do biomaterial a implantar. Para tal, dois métodos distintos têm sido empregues na tentativa de criar materiais com esta mesma característica de carga superficial [16]:

- Polarizar um biomaterial pela aplicação de um campo eléctrico externo a elevadas temperaturas para que haja uma deslocação de cargas positivas/negativas em direcções opostas;
- Desenvolver um biomaterial piezoelétrico para que se gere uma diferença de potencial no material por aplicação de uma força mecânica.

2.4- Hidroxiapatite

A hidroxiapatite (HAp) é um bio-cerâmico pertencente à família dos fosfatos de cálcio (CaP), sobre os quais vários estudos demonstraram as suas boas capacidades de interagir quimicamente com o osso [16]. A HAp tem sido alvo de uma particular atenção na investigação como possível substituinte ósseo, estando a sua elevada biocompatibilidade e bioactividade relacionada com o facto da HAp sintética ser bastante semelhante à componente mineral do osso (que como referido anteriormente constitui aproximadamente 60% do tecido ósseo) [15,16].

Existem vários fosfatos de cálcio, diferenciando entre si a razão molar entre os iões Ca e P (Ca/P). A HAp pertence ao grupo das apatites ($A_{10}(BO_4)_6X_2$) a sua razão molar Ca/P é de 1.67 (semelhantes às apatites do osso) e a sua fórmula é $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. A sua estrutura consiste numa matriz de iões hidroxilos (OH^-), localizados no centro de um triângulo de Ca^{2+} , ao longo do eixo-c numa célula hexagonal. Os iões OH^- estão alinhados em colunas paralelas com o eixo-c, juntamente com os Ca^{2+} (em diferentes planos) e os PO_4^{3-} [17]. Possui uma estrutura cristalina hexagonal, apresentando como parâmetros de rede $a=b=9.4210\text{\AA}$ e $c=6.8970\text{\AA}$, ilustrada em Figura II.2 [18].

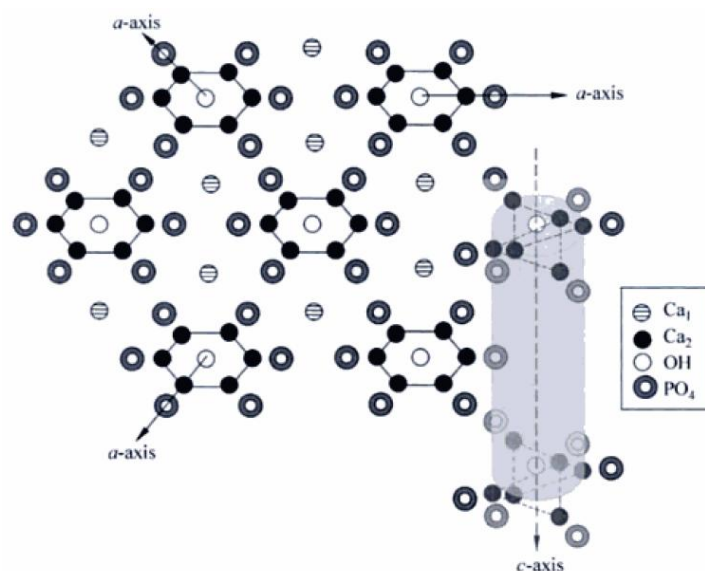


Figura II.2- Representação esquemática da estrutura da HAp [19].

Como referido anteriormente, a HAp é um material bastante utilizado em aplicações biomédicas, nomeadamente nas áreas de ortopedia, odontologia e dispositivos médicos. As suas

aplicações clínicas envolvem a reparação de defeitos ósseos, aumento ósseo, bem como revestimentos de implantes metálicos [11].

2.4.1- Polarização da Hidroxiapatite

Na ausência de propriedades significativas de piezoelectricidade na HAp, surgiu o interesse de proceder à polarização da mesma através da aplicação de um campo eléctrico, com o intuito de se criarem neste material superfícies carregadas positiva/negativamente.

A técnica mais comumente utilizada para polarizar a HAp, consiste na colocação deste material entre dois eléctrodos, sendo depois aquecida até à temperatura desejada, na qual é aplicado um campo eléctrico constante DC por um determinado tempo (usualmente 1h) período após o qual a HAp é arrefecida até à temperatura ambiente ainda com o campo aplicado. Sendo este o princípio básico, tanto a temperatura de polarização, a intensidade do campo aplicado e a duração de aplicação do mesmo são variáveis susceptíveis de ser alteradas consoante o pretendido e que influenciam directamente os mecanismos responsáveis pelo efeito da polarização obtido são recomendadas temperaturas elevadas, na ordem dos 200-300°C [20,21,22,23].

A polarização da HAp a elevadas temperaturas por aplicação de um forte campo eléctrico deve-se a dois fenómenos distintos:

- Reordenamento da matriz de OH^- provocada pela reorientação dos protões em torno dos iões O^{2-} ;
- Condutividade iónica devido à migração de iões OH^- ou H^+ ao longo das colunas de OH^- .

A HAp polarizada possui uma superfície carregada negativamente e outra positivamente, sendo necessário recorrer-se à técnica de TSDC (correntes termoestimuladas de despolarização/thermally stimulated depolarization current), para avaliar o nível de polarização obtido, nomeadamente a quantidade de carga acumulada, factor essencial no estímulo da deposição de cristais inorgânicos de cálcio fosfatados (técnica essa que será alvo de um maior detalhe mais à frente no presente trabalho) [22,23].

2.5- Titanato de Bário (BT)

Investigações visando materiais cerâmicos piezoelétricos para efeitos de implantação óssea, têm-se focado essencialmente em materiais contendo Titanato de Bário (BT) (BaTiO_3), um conhecido cerâmico ferroelétrico a temperaturas inferiores a 120°C , caracterizado pelo facto dos seus iões se orientarem em conformidade com um campo eléctrico externo suficientemente forte que lhe seja aplicado, permanecendo estes alinhados consoante o seu sinal de carga após a remoção do mesmo (não retornando, portanto, à sua posição original). Tal como no osso, a propriedade piezoelétrica advém da formação de um dipolo eléctrico devido a uma distribuição assimétrica das cargas eléctricas [24].

A temperaturas elevadas, acima da temperatura de Curie (T_c) de 120°C , o BT apresenta uma estrutura da perovskite, com catiões grandes de Ba^{2+} nos cantos e um menor de Ti^{4+} no centro do corpo e aniões O^{2-} no centro de cada uma das faces do cubo. Esta estrutura simétrica não apresenta um dipolo eléctrico, pelo que não é ferroelétrica nem piezoelétrica [12,24].

Entre a T_c de 120°C e os 5°C , o BT adopta uma estrutura tetragonal, esta agora assimétrica e com coeficiente piezoelétrico de 90 pC/N . A temperaturas mais reduzidas, pode ainda adoptar uma estrutura ortorrômbica ou romboédrica, dependendo da temperatura.

Associada à transformação de fase cúbica (perovskite) para tetragonal, está uma polarização espontânea, a qual resulta duma mudança relativa da posição dos iões, causando uma concentração de cargas positivas/negativas em posições opostas do cristal, formando-se um dipolo eléctrico. Neste tipo de estrutura, o ião central Ti^{4+} relativamente aos iões O^{2-} pode-se situar em duas posições diferentes, sendo que nenhuma delas é no centro da célula unitária, o que faz com que os centróides de cargas positivas não coincidam com o das cargas negativas Figura II.3 [24,12,25].

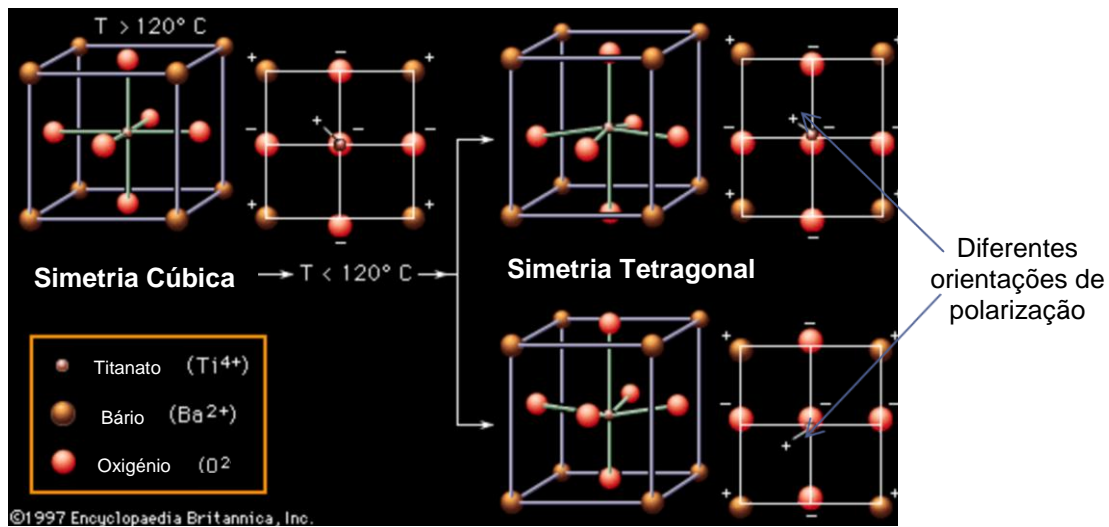


Figura II.3- Representação da estrutura cúbica e tetragonal da célula unitária de BT. Adaptado de [19].

No BT, para que os dipolos fiquem alinhados numa única direcção tem de se proceder à sua polarização. O processo utilizado para polarizar o BT é semelhante ao utilizado para a HAp, durante o qual o movimento dos iões está sujeito a restrições estruturais do próprio BT, pelo que a aplicação de um campo eléctrico externo resulta necessariamente na polarização na direcção de uma qualquer das faces da estrutura tetragonal.

A menor dimensão dos grãos de BT influenciam a T_c no sentido da sua diminuição. Com uma dimensão de grão de $0.12\mu\text{m}$, a T_c é à temperatura dita ambiente (27°C), tornando inviável em termos biológicos a sua polarização [26], razão pela qual os pós BT seleccionados para estudo possuem dimensões superiores.

2.6- Estado de arte da interacção da HAp e do BT com o organismo/tecido ósseo

De seguida encontram-se resumidos alguns dos estudos considerados mais relevantes no que diz respeito às respostas *in vitro* e *in vivo* da hidroxiapatite (HAp), do titanato de bário (BT) e da mistura de ambos (HABT).

2.6.1- Resposta *IN VITRO*

2.6.1.1- HAp

Yamashita et al. em 1996, pretenderam estudar a bioactividade da HAp, tendo para isso procedido à sua respectiva polarização e colocação num meio simulador do fluido corporal (SBF). Verificou-se que à superfície do material ocorreu a deposição de apatites semelhantes às existentes no osso, em maior quantidade na superfície carregada negativamente do que na carregada positivamente [21].

Ohgaki et al. pretenderam estudar a resposta biológica da HAp utilizando para isso osteoblastos. Do referido estudo, não se verificou um aumento de células nas superfícies da HAp nas primeiras 24h, no entanto 48h após colocação em meio contendo osteoblastos, a superfície carregada negativamente já possuía grandes quantidades de células depositadas. Neste mesmo estudo, fez-se também uma comparação entre a superfície positiva de HAp polarizada, com a de uma superfície neutra, isto é, HAp sem ter sido polarizada, verificando-se uma maior deposição de células nas superfícies da HAp não polarizada. Deste estudo, resultou uma proposta de modelo de interacção da HAp com o organismo [27], o qual será explicitado em maior detalhe mais à frente no presente trabalho (secção 2.7, Figura II.6).

Numa investigação feita por Jeong et al. os resultados são concordantes com o estudo acima supracitado, no qual quatro dias após o início do teste se verifica um maior número de células nas superfícies carregadas negativamente do que nas superfícies neutras [28].

Resultados também eles concordantes com os estudos referidos acima, foram encontrados por Dekhtyar et al., no qual uma quantidade dez vezes superior de células foi

encontrada na superfície carregada negativamente quando comparada com uma superfície neutra [29].

Resultados diferentes foram encontrados por Kizuki et al., que encontraram um maior número de osteoblastos nas superfícies positivas do que nas negativas após 2 dias de imersão. De acordo com este mesmo estudo, menos células foram também encontradas nas superfícies negativas do que nas não polarizadas [30].

Mais recentemente, Nakamura et al. encontraram evidências de que a migração de osteoblastos em HAp polarizada é maior do que na não polarizada. No entanto, contrastando com estudos mais antigos, as melhorias aconteceram em ambas as superfícies polarizadas, ou seja, tanto nas superfícies negativas como nas positivas [31].

Apesar dos mecanismos de interacção propostos por Ohgaki et al. [27], parecerem ter algum mérito e de estarem de acordo com resultados mais antigos, existem estudos mais recentes que não estão em concordância com o postulado. Diferenças nos protocolos de testes de bioactividade podem estar na origem destas mais recentes diferenças de resultados. A variedade de células usadas, a própria rugosidade das superfícies das amostras, respectivas densidades e dimensão dos grãos de HAp, entre outras variáveis, são algumas das razões que podem explicar a obtenção de resultados aparentemente contraditórios. Sendo mesmo possível que a diferença dos protocolos utilizados em cada estudo impossibilite uma comparação válida e científica dos seus respectivos resultados [22].

2.6.1.2- BT

Se por um lado a HAp é capaz de produzir e de reter uma carga superficial após a polarização, por outro é incapaz de tal quando se lhe é aplicada uma força mecânica. Já os materiais piezoeléctricos são capazes de produzir/reter um campo eléctrico quando sujeitos a polarização externa e quando submetidos a forças mecânicas. Devido a estas características, este tipo de material é susceptível de ser utilizado para mimetizar o comportamento do osso, uma vez que como visto anteriormente, este possui características piezoeléctricas (com a existência de cargas à superfície).

Num estudo de bioactividade em BT, amostras deste material foram polarizadas a diferentes temperaturas e submersas em SBF por um período de 30 dias. Foi demonstrado que uma polarização a temperaturas superiores à temperatura de Curie é essencial para uma boa polarização do material. A formação de CaP ocorreu preferencialmente na superfície negativa da

amostra, levando à sugestão por partes dos autores do estudo que a capacidade regenerativa do osso é melhor na sua superfície negativa [32].

Um estudo feito pelo mesmo grupo submeteu amostras de BT polarizada a uma imersão em Modified Eagle's Medium (MEM), na qual foi possível verificar um crescimento preferencial de apatites na face negativa da amostra quando comparado com a sua positiva. Os autores sugerem que o ião Ca^{2+} é mais rapidamente adsorbido na superfície negativa, indo actuar como núcleo para a formação de cristais de CaP. No mesmo estudo, foi também analisada a formação de CaP em filmes de BT imersos em MEM, no qual se verificou a formação de uma camada mais espessa e homogénea de CaP na superfície carregada negativamente, quando comparada com uma não polarizada. Foi ainda analisada a resposta biológica de fibroblastos da linhagem L929 de ratos a filmes de BT, que em conformidade com resultados do mesmo estudo, se verificou uma preferência de ligação e de proliferação celular à superfície negativa do respectivo filme [33].

Um trabalho realizado por Li et al. analisou as respostas biológicas da adição de pós de BT a um implante de óxido de titânio (IV) (TiO_2), tendo verificado um aumento da proliferação de osteoblastos na superfície das amostras, amostras essas que foram polarizadas e submetidas a pressões mecânicas, com o intuito de se induzir uma resposta piezoeléctrica. Como conclusão deste mesmo trabalho, é sugerida a existência de benefícios em usar materiais piezoeléctricos previamente polarizados para intuitos de substituição óssea, uma vez que foram encontrados um maior número de células em amostras polarizadas quando comparadas com não polarizadas em períodos temporais menores [34].

2.6.1.3-Misturas de HAp com BT (HABT)

A utilização de HABT para enxertos ósseos foi inicialmente sugerida por Feng et al. [35].

Recentemente, um estudo *in vitro* utilizando osteoblastos em amostras polarizadas e não polarizadas de HABT, indicou um aumento, no primeiro dia, da adesão celular em ambas as superfícies do material polarizado, independentemente do sinal da carga. Após longos períodos de exposição, o número de células é semelhante em ambos os tipos de amostra. Neste mesmo estudo ficou demonstrada a biocompatibilidade da mistura HABT e respectiva não toxicidade [36].

O estudo supracitado está em sintonia com trabalhos realizados anteriormente por Li et al. que também atestaram a biocompatibilidade da mistura HABT até uma percentagem de 20% de BT [34].

2.6.2-Resposta *IN VIVO*

2.6.2.1- HAp

Itoh et al. observaram uma melhoria na actividade de osteoblastos em ambas as superfícies de uma placa de HAp polarizada implantada na parte superior do crânio de ratos, em oposição com uma diminuição de actividade dos osteoclastos. Os autores atribuem o aumento da formação do osso verificada na superfície negativa, devido à acumulação de iões Ca^{2+} na superfície. Por seu lado, na superfície positiva as diferenças observadas foram atribuídas à adesão de moléculas, melhorando a migração de osteoblastos [22].

Em concordância com o estudo acima mencionado, Nakamura et al. implantaram enxertos de HAp polarizada na tíbia de cães. A existência de cargas à superfície mostrou ter influência na adsorção de proteínas, mais especificamente, maiores quantidades de fibrina foram encontradas em ambas as superfícies polarizadas quando comparadas com as neutras. Os autores concluíram que os grupos COOH da fibrina são electrostaticamente atraídos para as cargas positivas. Os iões de Ca^{2+} são atraídos para as cargas negativas, resultando na formação de uma camada positiva de iões carregados, que consequentemente promove a adsorção de fibrina. Este aumento da camada de fibrina resulta numa melhor osteocondutividade em ambas as superfícies através de um aumento na adesão e activação das plaquetas [37].

Um estudo feito, introduzindo implantes de titânio revestidos de HAp no fémur de cães, está de acordo com o acima referido, no qual se verificou que a adesão do tecido ósseo a implantes (medidas através da força necessária para remover o implante) com revestimento de HAp polarizada é maior do que no caso em que o revestimento não é polarizado. Entre superfícies polarizadas, foi a de superfície negativa que apresentou uma maior ligação com o tecido ósseo [38].

Dois estudos efectuados utilizando implantes porosos de HAp em coelhos para efeitos de crescimento ósseo, obtiveram resultados semelhantes ao de estudos que utilizaram HAp não porosa. Isto é, em ambos os estudos, o crescimento ósseo foi observado em todo o implante polarizado poroso, independentemente do sinal da carga [39,40].

2.6.2.2- BT

Os primeiros estudos para examinar a possibilidade de se utilizar BT como material para enxertos ósseos foram realizados em 1980. Amostras cerâmicas porosas com coeficiente de tensão piezoelétrica de 9×10^{-3} mV/N foram implantados no fémur de cães durante um período de 16 e de 86 dias. Após extracção e análise dos enxertos, verificou-se a existência de uma maior diferença de potencial com o aumento do período de teste. Este facto foi atribuído pelos autores ao aumento da osteointegração com o tempo, que por sua vez proporcionou uma melhor transferência de carga mecânica para os implantes. Ficou ainda demonstrado que o BT possui um elevado grau de biocompatibilidade evidenciado pela ausência de infiltrado inflamatório e de reacções de rejeição por parte do tecido circundante [41].

Posteriormente foi realizado pelo mesmo grupo um estudo visando comparar as respostas biológicas a cerâmicos de BT polarizados e não polarizados. O método de implantação foi semelhante ao do referido no estudo anterior. Não foram encontradas diferenças no crescimento ósseo nem na existência de uma maior ligação física ao osso entre amostras polarizadas e não polarizadas. Os autores concluem que de acordo com resultados anteriores, a geometria dos buracos feitos no osso para implantação dos enxertos neste estudo em particular pode ter restringido as forças mecânicas exercidas sobre os mesmos, conduzindo a uma ausência de formação de cargas por meio destas mesmas forças [42].

Num outro estudo realizado em aves, para explicar os seus resultados concordantes com o estudo acima supracitado, Park et al. também afirmam que a explicação para a não formação de cargas à superfície por parte dos enxertos de materiais piezoelétricos, se deve a uma incorrecta implantação dos mesmos (neste caso em particular, alegam a inexistência de pressão suficiente nos enxertos devido ao reduzido peso das aves). É ainda mencionado que o BT previamente polarizado não apresentou melhores respostas biológicas que o BT não polarizado, possivelmente devido ao facto de as cargas resultantes do processo de polarização, serem menores do que noutros estudos que asseguraram a sua influência positiva [41,42].

A maior parte dos trabalhos realizados *in vivo* sobre materiais piezoelétricos não consegue reproduzir com precisão as pressões mecânicas a que os ossos normalmente estão sujeitos. Seja pela incorrecta orientação do material implantado, onde o movimento natural da cobaia não promove a pressão no enxerto, seja pela incorrecta implantação dos mesmos, no sentido em que são criados buracos demasiado grandes para colocação do enxerto, fazendo com que o mesmo não sofra pressão mecânica. Nestes casos, qualquer diferença de resposta celular entre materiais piezoelétricos polarizados e não polarizados resulta das cargas já existentes nas

superfícies dos referidos materiais e não especificamente das suas propriedades piezoeléctricas. Nos casos em que foi possível exercer-se algum tipo de pressão mecânica, verificou-se uma melhoria na resposta biológica.

2.6.2.3-HABT

Para estudar o composto HABT, foram colocados por Feng et al. enxertos deste material polarizado e enxertos apenas com HAp para efeitos de controlo em ossos de mandíbulas de cães. Relativamente à mistura HABT não é fornecida informação sobre a proporção de cada um dos constituintes. Comparando com enxertos de HAp, a cerâmica biológica piezoeléctrica HABT promoveu significativamente a osteogénese. Houve um melhor crescimento ósseo nos enxertos de HABT do que nos de controlo apenas com HAp. O crescimento ósseo nos enxertos processou-se de forma alinhada com a direcção da polarização previamente feita e com melhores resultados quando a implementação do enxerto é feita respeitando sentido da pressão exercida pelo mastigar do cão. Os autores afirmam que estes resultados demonstram a existência de uma relação clara entre a osteogénese e as cargas geradas num material piezoeléctrico [35].

2.6.3-Resumo da revisão bibliográfica efectuada

Existem resultados contraditórios em alguns dos testes *in vitro* e *in vivo* realizados para testar a resposta biológica da polarização da HAp e do BT, assim como na mistura de ambos (HABT). Mais especificamente, estudos mais antigos realizados *in vitro*, que relatavam uma menor actividade celular na superfície positiva têm vindo a ser contestados por estudos *in vitro* e *in vivo* mais recentes. São os estudos *in vitro* mais recentes, cuja previsão aponta no sentido de uma maior actividade celular em ambas as superfícies polarizadas, independentemente da carga em causa, que correspondem mais exactamente à resposta celular observada *in vivo*.

Os métodos *in vitro* actuais variam bastante em termos de células usadas, do meio simulador do organismo como em outros aspectos protocolares. Por muito rigoroso e minucioso que tenha sido o planeamento destes estudos, ainda não é hoje possível reproduzir a complexidade química, mecânica, eléctrica e biológica dos testes *in vivo*. Particularmente, estudos de cultura celular não levam em consideração a presença de sangue no local do implante. Certas proteínas, células sanguíneas estão presentes em testes *in vivo* mas geralmente ausentes durante os testes *in vitro* por razões práticas. Não obstante essas condicionantes, os testes *in vitro* servem como uma primeira ferramenta para o teste biológico, reduzindo a necessidade da utilização de animais e fornecendo “pistas” para possíveis respostas em

organismos vivos. A existência de discrepâncias entre estes dois tipos de testes torna-se evidente após uma breve revisão da bibliografia disponível, indiciando uma necessidade de cuidado na interpretação de resultados de testes *in vitro*.

A maior parte dos estudos realizados *in vivo* evidenciam um maior efeito benéfico em termos de crescimento e de reparação óssea por parte da HAp polarizada quando comparada com a HAp não polarizada. Neste tipo de estudos, a generalidade dos resultados aponta também para uma indução de melhoria de respostas biológicas em ambas as superfícies, mais marcadamente na negativa. No entanto, mais testes *in vivo* devidamente protocolados são necessários para que de forma assertiva e conclusiva seja possível afirmar a mais-valia de polarizar a HAp e explicar os seus respectivos mecanismos de acção biológica.

Por regra nos estudos *in vivo* ou *in vitro*, em que são asseguradas as condições de aplicabilidade de uma força mecânica sobre cerâmicos piezoelétricos (BT), verifica-se uma melhoria na resposta biológica. Nos estudos em que os implantes piezoelétricos não são colocados de uma forma correcta para serem submetidos a pressões mecânicas de uma forma “natural”, não se obtiveram melhores resultados do que de enxertos electricamente neutros. Pode-se por isso atribuir à propriedade piezoelétrica uma conotação positiva no que diz respeito à obtenção de uma melhor resposta biológica por parte dos implantes. Adicionalmente, a falta de melhoria de resposta biológica por parte de materiais piezoelétricos polarizados não sujeitos a pressões mecânicas durante os períodos de teste, sugere que a carga resultante do processo de polarização, não é suficientemente grande nos testes *in vivo* feitos até agora para que se verifique uma melhoria da resposta. No entanto, a escolha de controlos inadequados em alguns dos estudos implica que qualquer influência remanescente da polarização pode não ter sido devidamente estudada isoladamente dos efeitos da geração de cargas por efeito de pressão mecânica.

Os mecanismos pelos quais cargas e propriedades piezoelétricas afectam a resposta biológica ainda são alvo de discussão, não havendo um consenso generalizado sobre esta matéria. Até à data, o modelo preferencial destes mecanismos prende-se com a adsorção de proteínas, iões e outras moléculas de forma diferenciada e dependente do material específico e respectivo estado eléctrico. Daí que se justifique por exemplo, que uma superfície carregada positivamente de BT induza uma resposta biológica diferente do que uma superfície positiva de HAp.

A evidência de vários estudos existentes na literatura é difícil de ser directamente comparada, uma vez que a composição exacta dos materiais, as suas cargas, o tipo de células usadas em testes *in vitro* e os modelos *in vivo* mudam bastante, sendo no entanto, comumente

aceite por indicação da generalidade dos estudos sobre a matéria, que a HAp polarizada e compostos baseados em BT possuem o potencial de melhorar as respostas biológicas.

Um estudo uniforme e devidamente controlado comparando um compósito de HAp com um bio-cerâmico piezoeléctrico como o BT, polarizado e não polarizado, seria uma forma efectiva de averiguar mais exactamente se o potencial eléctrico gerado nos materiais piezoeléctricos tem mais ou menos vantagens do que cargas estáticas nas superfícies da HAp polarizada. Assim permitindo uma melhor compreensão de como o corpo responde a materiais polarizados e a materiais piezoeléctricos em condições normais ou de polarização.

No seguimento da necessidade de um estudo capaz de averiguar assertivamente estas variáveis, surgiu a ideia de se executar o presente estudo que se espera ser capaz de responder a algumas questões levantadas durante a revisão bibliográfica referente a estudos já realizados na área.

2.7- Mecanismos de interacção biológica da HAp e do BT

De uma forma bastante generalista, os materiais bioactivos interagem com os tecidos circundantes através do estabelecimento de ligações químicas. Os mecanismos de interacção são determinados por factores químicos/estruturais (estrutura molecular e fases cristalinas), físicos (dimensão dos grãos, rugosidade da superfície, porosidade do material) e eléctricos dos materiais.

Pelo exposto na secção anterior, nomeadamente pelas diferenças nos resultados obtidos, é evidente a não existência de uma explicação comumente aceite entre a comunidade científica, para as respostas biológicas à HAp, ao BT e à mistura HABT.

Embora não haja um consenso e o assunto necessite de ser alvo de mais investigação, existem mecanismos de interacção biológica que dispõem de um maior apoio científico do que outros. Serão expostos de seguida, alguns destes modelos mais representativos:

2.7.1- Modelos de interacção biológica do BT

Após tratamento de polarização, catiões como Ca^{2+} dissolvidos no SBF são rapidamente adsorvidos pela superfície negativa, não sucedendo o mesmo na superfície positiva. Aniões como o HPO_4^{2-} e o OH^- existentes no meio depositam em torno dos catiões anteriormente adsorvidos. Desta forma, os iões Ca^{2+} agora na superfície negativa actuam como precursores da formação de CaP. Como na superfície positiva estes não estão presentes, não se inicia o processo de formação de apatites Figura II.4 [32].

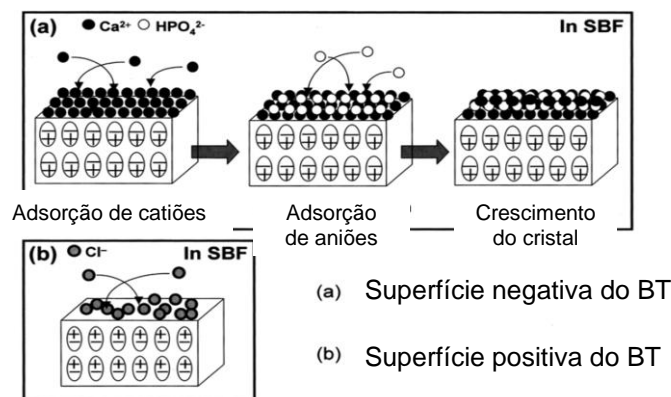


Figura II.4- Esquema representativo da interacção de BT polarizado imerso em SBF. Adaptado de [32].

2.7.2- 2 Modelos de interacção biológica da HAp

1

Takadama et al. [43] observaram em biovidros que, por baixo das apatites semelhantes ao osso, se encontram apatites precursoras ricas em cálcio, sugerindo que a formação das mesmas se processa à superfície.

Imersa em SBF, a HAp é capaz de apresentar uma superfície carregada negativamente pela exposição de unidades de hidroxilo e de fósforo na sua estrutura cristalina. Estas cargas negativas possibilitam uma interacção específica com os iões positivos de Ca^{2+} existentes no fluido, formando consequentemente apatites ricas em cálcio. A formação destas apatites surge por acumulação dos referidos iões de Ca^{2+} , que acabam por tornar esta apatite positivamente carregada. Posteriormente, esta nova superfície criada irá interagir especificamente com os iões fosfato existentes na solução, criando assim uma camada de apatite pobre em cálcio. Esta camada de apatite pobre em Ca agora depositada, mediante um processo de cristalização, funciona como precursora de apatites semelhantes ao osso. Uma vez ocorrida esta transformação, estando a HAp mergulhada num meio supersaturado em iões como é o SBF, a apatite cresce espontaneamente consumindo iões de cálcio e de fósforo, incorporando simultaneamente iões menores como o sódio, magnésio e carbonato, desenvolvendo desta forma minerais semelhantes aos existentes no osso, tanto quimicamente como fisicamente [44].

Na Figura II.5, é possível observar de uma forma esquemática todo este processo dinâmico de formação de apatites.

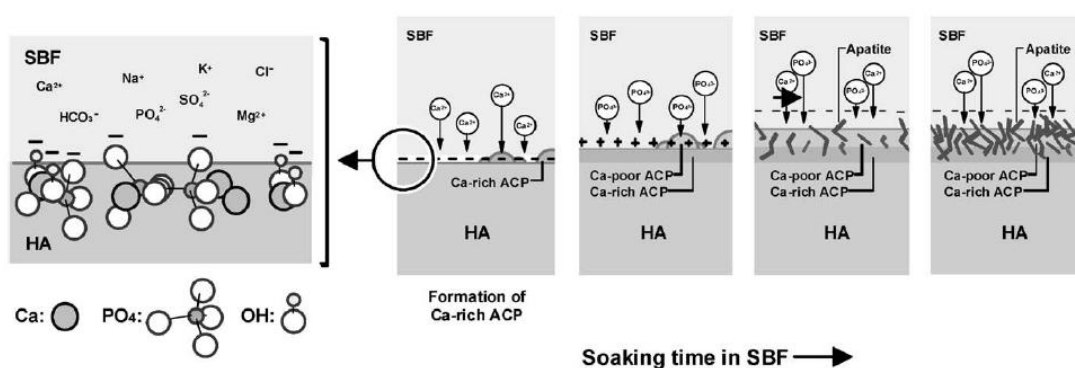


Figura II.5- Esquema representativo da interacção de HAp imersa em SBF [44].

2

Na Figura II.6 encontram-se representadas as interacções existentes entre as superfícies carregadas e as substâncias circulantes no meio, responsáveis pelos processos de adesão celular. As substâncias químicas existentes no meio, tais como iões orgânicos e inorgânicos, grupos iónicos, aminoácidos e proteínas, possuem em princípio todos a mesma oportunidade de contactar e de se associarem à superfície da HAp. Apresentando os grupos carregados e restantes substâncias comportamentos diferentes de atracção e de repulsão consoante as cargas existentes à superfície da HAp. Este processo de adesão por parte dos diferentes constituintes pode ser encarado como uma reacção de competição, na qual o ião Ca^{2+} possui duas funções significativas: promover o processo de nucleação cristalina e promover a adesão por parte das proteínas. As cargas superficiais originadas pelo processo de polarização possuem a capacidade de promover esta mesma reacção de competição, especialmente no comportamento do ião Ca^{2+} .

Durante a formação de uma camada de apatite, os iões Ca^{2+} são predominantemente adsorvidos na superfície negativa da HAp, devido à sua maior afinidade de ligação relativamente a outros cations existentes no meio, tais como Na^+ , K^+ e Mg^{2+} . Aliás, a adsorção de Ca^{2+} promove a adesão de proteínas responsáveis pela atracção de células. As proteínas de adesão detectam os iões Ca^{2+} e captam-no, ficando posteriormente a proteína intimamente ligada com a célula.

A superfície carregada positivamente atrai grupos aniónicos. Neste caso os grupos aniónicos tais como o HPO_4^{2-} e o HCO_3^{2-} actuam como inibidores da adesão celular. Os grupos de anião não induzem a formação de camadas apatíticas, e assim, a adesão celular é limitada na superfície positiva [27].

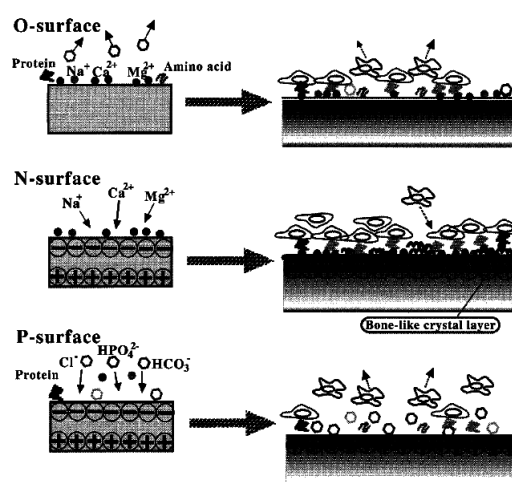


Figura II.6- Esquema representativo da interacção de HAp polarizada no organismo [17].

2.8- Método Sol-Gel

Devido ao elevado interesse na HAp, várias têm sido as técnicas de síntese desenvolvidas para a criação de pós deste material, nomeadamente reacções de estado sólido, combustão, método sol-gel, entre outros [45]. Dos diferentes processos de síntese existentes, o método sol-gel é aquele que tem recebido uma maior atenção por parte dos investigadores, devido às suas múltiplas vantagens quando comparado com outros métodos [46].

O método sol-gel existe há já algum tempo. Os primeiros géis de sílica foram feitos em 1845 por M. Ebelmen em França. No entanto, mais recentemente este método tem vindo a ser alvo de importantes desenvolvimentos, permitindo o desenvolvimento de novos materiais. Este progresso recente conduziu ao aparecimento de uma nova visão no domínio do fabrico de vidros e cerâmicos, colocando em evidência, a importância da química nos processos de fabrico de materiais, desde os seus percussos até à obtenção do produto final. [47]

O método sol-gel consiste num método químico aquoso que aplicado à síntese de HAp não necessita de um elevado valor de pH nem de uma elevada temperatura de sinterização. Providencia uma mistura de cálcio e de fósforo quimicamente homogénea e de elevada pureza. A elevada reactividade dos pós obtidos, permite uma redução da temperatura de processamento e uma minimização de qualquer fenómeno de degradação associada à fase de sinterização.

A baixa temperatura de formação e de fusão dos cristais de apatite tem sido o principal contributo para o sucesso do método sol-gel em relação a outros métodos. A menor dimensão dos grãos de pó formados, na ordem dos nanómetros é também um factor relevante a ter em consideração, parâmetro bastante relevante para melhorar a reacção de contacto e de estabilidade da interface osso natural/artificial [45,46].

2.8.1-Vantagens e Desvantagens do método Sol-Gel

De seguida, serão colocadas em relevo, algumas das vantagens e desvantagens associadas ao método Sol-Gel relativamente a outros métodos existentes para síntese de pós de HAp, procurando desta forma justificar a preferência deste método em detrimento de outros.

2.8.1.1-Vantagens

1. O produto final é caracterizado por uma dimensão à escala micro ou nano, permitindo uma melhor superfície de contacto de reacção e respectivas vantagens que lhe estão associadas [46].
2. Produção de materiais híbridos (inorgânicos e orgânicos) que não existem na natureza [47].
3. O produto obtido apresenta um elevado grau de pureza apenas sendo para isso necessário proceder à purificação dos precursores, seja por métodos de destilação, cristalização ou electrólise [47].
4. Os processos químicos dos primeiros passos são executados à temperatura ambiente [47].
5. A reduzida temperatura necessária para o processo de sinterização, minimiza consideravelmente as reacções secundárias [47].
6. Executando modificações químicas nos precursores, controlando os processos de hidrólise, de condensação, de nucleação e de crescimento coloidal primário, é possível controlar o tamanho, distribuição e porosidade do produto final obtido [47,48].
7. Minimização da formação de produtos secundários (CaO e β -TCP) [48].
8. Para efeitos deste estudo, o método Sol-Gel seleccionado para a elaboração de HAp, possui a particularidade de não exigir um controlo rigoroso de pH nem de um particular cuidado na agitação dos precursores, assim como um reduzido tempo necessário para a hidrólise dos fosfatos. Não é necessária a utilização de um catalisador para que a formação do gel seja atingida e não menos importante, os precursores utilizados são de custo reduzido [45,46].

2.8.1.2-Desvantagens

1. Possibilidade de hidrólise dos fosfatos [46].
2. Custo elevado dos precursores (regra geral), particularmente se os mesmos forem alcóxidos [46,47].
3. Elevados tempos de secagem e de envelhecimento [48].
4. O método Sol-Gel, para a síntese de cerâmicos, não é capaz de competir com a produção em grande escala, sendo bem mais interessante para a produção de cerâmicos mais sofisticados [47].

2.8.2-Etapas do método Sol-Gel

O método sol-gel pode ser resumido em 5 etapas principais, esquematizadas na Figura II.7:

1. Formação da solução inicial ou Sol
2. Formação do Gel ou gelificação
3. Envelhecimento
4. Secagem
5. Sinterização ou densificação.

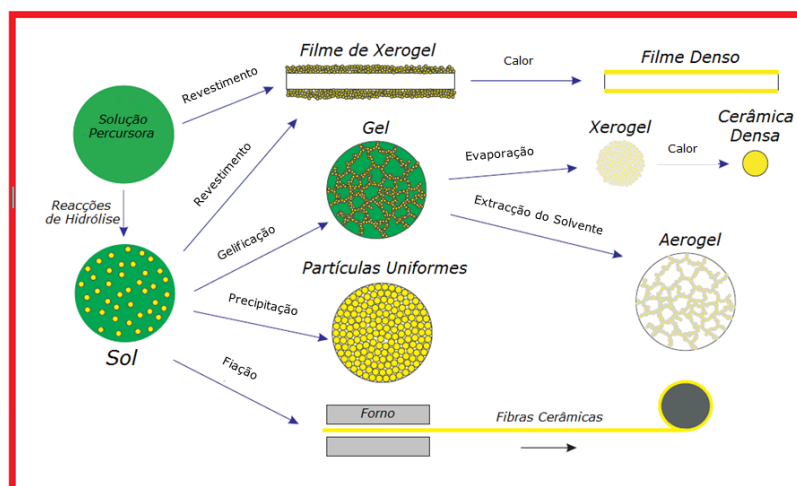


Figura II.7- Esquema representativo do método sol-gel. Adaptado de Chemat Technology [49]

2.8.2.1-Formação da solução inicial ou Sol

Existem diferentes tipos de precursores, classificados de acordo com as suas características físicas. O Sol tem a particularidade de ser uma suspensão coloidal, cuja fase dispersa é constituída por partículas de dimensões entre o 1nm e 1000nm, podendo a solução ser preparada a partir de diversos solventes, dependendo do precursor a ser utilizado [48,50].

2.8.2.2-Formação do Gel

O Gel propriamente dito, consiste numa rede porosa interligada, sólida e tridimensional capaz de se expandir de uma forma estável num meio líquido.

O processo de gelificação ocorre quando uma dispersão homogénea inicial (Sol) fica rígida, perdendo a sua homogeneidade e estabilidade [47]. Este processo pode ocorrer de três formas distintas: através de reacções químicas que ocorram entre as moléculas dos precursores, alterações de ordem química na solução ou por simples evaporação do solvente utilizado.

Independentemente do mecanismo que lhe deu origem, este inicia-se pela formação de agregados fractais ou unidades discretas tridimensionais. Aquando da gelificação, ocorre o chamado ponto gel ou transição Sol-Gel, verificando-se um aumento da viscosidade da solução através do qual, o Sol é transformado num gel coloidal ou polimérico, de acordo com o Sol que lhe deu origem [47].

Os Géis coloidais têm por base Sóis formados pela dispersão e/ou por formação de partículas carregadas ou não em meio líquido, no qual ocorre agregação linear de partículas por meio da alteração das condições físico-químicas da solução.

Os Géis poliméricos surgem por formação de estruturas tridimensionais com base em ligações covalentes entre longas cadeias poliméricas lineares, resultantes da polimerização de um monómero disperso em solvente.

Durante o processo de formação do Gel, as reacções químicas podem não ficar completas, pelo que a continuação das mesmas poderá ocorrer nas etapas seguintes, nomeadamente durante o envelhecimento, reforçando desta forma a rede tridimensional [48,50].

2.8.2.3-Envelhecimento

Fase na qual é iniciado o processo de evaporação do solvente do interior dos poros do Gel, na qual as propriedades físicas desse mesmo Gel são alteradas por diversos mecanismos, nomeadamente de polimerização, espessamento e transformações de fase. Nesta fase, verifica-se geralmente a ocorrência de processos de hidrólise, responsáveis pela quebra de cadeias e respectiva diminuição do seu peso médio [48].

2.8.2.4-Secagem

Nesta fase ocorre uma retracção do material, provocada pela remoção do solvente do Gel, que é caracterizado por um esqueleto fraco de material amorfo com uma rede interligada, a qual está preenchida de líquido entre os poros que o constituem. Tal remoção pode ser feita utilizando diferentes metodologias, que conduzem à formação de diferentes microestruturas características, das quais se destacam os aerogéis (extracção do solvente) e os xerogéis (evaporação “natural” do solvente) [48].

O processo de secagem pode ser subdividido em 2 diferentes estágios:

1. O Gel retrai numa proporção igual ao volume do líquido que evapora, permanecendo a interface líquido/ vapor na superfície exterior ao corpo cerâmico [48].
2. Aquando da diminuição do líquido no interior, o material torna-se demasiado rígido e os poros mais próximos da superfície enchem-se de ar, fazendo com que haja um fluxo contínuo de ar a entrar na estrutura ao mesmo tempo que um filme líquido é enviado para o exterior, prosseguindo a evaporação à superfície do material. Eventualmente, o líquido fica individualizado em bolsas e a secagem prossegue apenas por evaporação do líquido existente no interior do material, em simultâneo ocorre também difusão de vapor para o exterior [45].

2.8.2.5-Sinterização ou Densificação

Consiste na última etapa do método de Sol-Gel caracterizada por tratamentos térmicos sem que ocorra fusão completa das partículas. É nesta etapa que se elimina a porosidade e se reduz a área interfacial sólido-vapor.

Nos géis em que esta mesma área é considerável, a força motriz do processo deverá ser suficientemente grande para que seja possível a ocorrência de sinterização a temperaturas baixas, nas quais os processos de transporte são mais lentos. Os processos de desidroxilação e relaxamento que ocorrem durante a sinterização fazem com que aquecimentos mais rápidos permitam densificações a temperaturas mais baixas.

A temperaturas elevadas, nomeadamente acima dos 250°C, a rede molecular dos géis sofre um processo de pirólise, ocorrendo a produção de compostos voláteis que se traduzem numa perda de peso. Acima dos 800°C, os resíduos orgânicos são removidos através de um processo de descarboxilação.

A temperaturas reduzidas, por volta dos 150°C, verifica-se uma evaporação do solvente, usualmente água adsorvida e de moléculas fracamente ligadas [48,50].



III- Objetivos

Após o enquadramento teórico do tema em estudo, no presente capítulo definem-se os objectivos gerais e específicos do trabalho.

Conforme evidenciado no enquadramento do trabalho como ao longo da revisão de literatura, ainda há bastante a desenvolver no campo dos materiais para implantes, nomeadamente no que diz respeito a enxertos ósseos. Tal facto conduziu ao interesse e relevância do presente estudo, procurando-se não só contribuir para o debate na matéria como também apresentar e desenvolver novos conhecimentos.

Tendo em mente o cumprimento do predisposto, foram definidos objectivos gerais e específicos de investigação que adiante se descrevem:

Objectivos gerais:

- Mediante uma revisão de literatura, descrever o estado de arte no que diz respeito ao desenvolvimento de materiais para enxertos ósseos com especial incidência no aumento da bioactividade devido a superfícies com carga superficial;
- Estudar os mecanismos de interacção da HAp sintética e do BT com o organismo;
- Estudar a influência na bioactividade da adição de BT a HAp sintética para enxertos ósseos;
- Melhorar o comportamento da HAp sintética e do titanato de bário no que respeita à sua integração óssea.

Objectivos específicos:

- Mediante várias técnicas de caracterização analisar morfológicamente e estruturalmente a HAp sintetizada pelo método Sol-Gel e o BT comercialmente adquirido;
- Síntese de amostras de HAp e de HABT para efeitos de estudo das suas capacidades eléctricas e dieléctricas;
- Realização de testes de bioactividade em SBF utilizando amostras de HAp sintetizada e de HABT, analisando-se a precipitação de apatites e medição de concentrações iónicas em SBF;
- Verificar se as apatites depositam na HAp sintetizada e no BT;
- Verificar se as amostras utilizadas se dissolvem em SBF;
- Determinar qual a melhor composição percentual de HAp e de BT no composto HABT para efeitos de estimulação do crescimento ósseo.

IV- Metodologia

4.1- Técnicas de caracterização/preparação das amostras

4.2- Procedimento experimental

4.1- Técnicas de caracterização/preparação das amostras

4.1.1- Difracção por Raios-X

A técnica de XRD (X-ray diffraction), ou em português, difracção por raios-X (DRX), permite obter informação sobre a micro-estrutura de um determinado material, nomeadamente neste trabalho, as diferentes fases cristalográficas presentes na hidroxiapatite e no titanato de bário. Se o material for cristalino, os iões, átomos e moléculas do material apresentam um arranjo periódico, por outro lado se for amorfo, os iões, átomos e moléculas encontram-se distribuídos de um modo aleatório.

Dado que os comprimentos de onda (c.d.o.) dos raios-X são aproximadamente iguais às distâncias entre os planos atómicos característicos dos sólidos cristalinos, a colisão de um feixe destes mesmos raios com a referida rede cristalina, produz picos reforçados de radiação, responsáveis pelo padrão de difracção característico de um determinado sólido cristalino.

Bragg, em 1913, foi capaz de demonstrar a relação existente entre o c.d.o. dos raios-X e respectivo ângulo de incidência com a distância entre as diferentes camadas de átomos, relação conhecida como Lei de Bragg, que se representa da seguinte forma:

$$n\lambda = 2d \sin(\theta), \quad (\text{Equação IV.1})$$

onde n é um número natural que representa a ordem de difracção, λ o c.d.o. dos raios-X, d a distância entre os diferentes planos cristalográficos e θ o ângulo que o raio incidente faz com os planos de reflexão.

Ao existir uma relação entre a distância d , o c.d.o. λ dos raios-X e o ângulo de incidência θ , as reflexões reforçam-se umas às outras, ou seja, estão em fase. No entanto, se o ângulo θ não satisfizer a condição necessária para que as diferentes reflexões estejam em fase, a interacção entre elas, irá produzir um feixe fraco ou nulo. Os diferentes planos de difracção, assim como as suas respectivas distâncias interplanares, a densidade dos átomos ao longo de cada plano

cristalino assim como o padrão de difracção gerado, são características específicas e únicas de cada material cristalino [51].

4.1.2- Espectroscopia de Infra-Vermelhos por transformada de Fourier

A técnica FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), ou em português, espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier, é uma técnica de caracterização óptica, útil na identificação dos grupos funcionais e, conseqüentemente, de compostos químicos. Esta análise pode ser feita a compostos químicos orgânicos e inorgânicos, nos seus diferentes estados (sólido, líquido e gasoso).

Esta técnica baseia-se no princípio da absorção da radiação infravermelha por parte das ligações covalentes existentes entre átomos e moléculas. Esta mesma absorção provoca alterações no estado vibracional das moléculas, no sentido de que se a frequência da radiação incidente é próxima à da frequência de vibração normal da rede, ocorre absorção “máxima” de energia e respectivo aumento da amplitude das vibrações das ligações covalentes.

De acordo com a mecânica quântica, o estado fundamental corresponde ao estado de menor energia enquanto que os vários estados excitados são estados com energias mais elevadas. A absorção da radiação ocorre somente em determinadas zonas específicas do espectro, que dependem de variados factores, como por exemplo o tipo de ligações covalentes presentes, os átomos envolvidos e o próprio modo de vibração. De um modo geral, os modos de vibração podem ser divididos em dois grandes grupos:

- Stretching (estiramento), que implica mudanças no comprimento das ligações, ou seja, alteração na distância inter-atômica ou não inter-molecular dependendo do caso
- Bending (flexão), que implica mudanças no ângulo das respectivas ligações, ou seja, na posição relativa dos átomos ou moléculas envolvidas.

A aquisição de dados do espectro de FTIR pode ser obtida no modo de transmissão, detectando a radiação que atravessa a amostra, ou alternativamente no modo de absorção, medindo a radiação absorvida pela amostra. Executando um varrimento em frequência da radiação electromagnética, obtém-se um espectro de transmissão, ou de absorção, que permite evidenciar as zonas de absorção dos grupos funcionais através da presença de bandas de vibração características [51].

4.1.3- Dispersão de pós por ultra-sons

Uma das dificuldades da utilização de pós ultra-finos à escala nanométrica para produção de matérias cerâmicas, prende-se com a tendência que estes têm de formar aglomerados aquando da sua síntese ou mistura, sendo isto fonte de heterogeneidade e de defeitos nos produtos finais. Por este facto, a garantia da homogeneidade de um cerâmico revela-se de fundamental importância, sendo a tecnologia de ultra-sons capaz de resolver este problema [52].

Tipicamente sub-divididos em 3 categorias distintas, consoante a sua frequência Tabela IV. 1:

Tabela IV. 1- Categorias de ultra-sons.

Categoria	Leque de Frequência
Alta frequência/ ultra-sons de diagnóstico	2MHz a 10MHz
Frequência Intermédia/ ultra-sons de efeitos sonoquímicos	300kHz a 1000kHz
Baixa frequência/ ultra-sónica convencional	20kHz a 100kHz

Os ultra-sons são definidos como sons de frequência superior a 16kHz, imperceptíveis à audição humana, que se propagam em ciclos sucessivos de compressão e rarefacção através do meio irradiado conduzidos pela variação de pressão. Podem ser utilizados com diferentes finalidades, nomeadamente de homogeneização, desintegração/desaglomeração, moagem húmida, desintegração celular, desgaseificação de líquidos, entre outras [52,53].

À escala laboratorial, existem dois mecanismos distintos de aplicação de ultra-sons, o banho ultra-sónico e a sonda ultra-sónica (*probe*), tendo sido esta última, a usada no presente estudo. Na *probe*, a sonda ultra-sónica é fixa na extremidade do amplificador do transdutor e directamente imersa no meio reaccional. Em termos de potência este sistema apresenta um desempenho 100 vezes superior ao sistema alternativo de banho ultra-sónico [54].

A mistura de pós em líquidos é uma prática comum na formulação de vários materiais. As partículas individuais tendem a formar aglomerados devido à acção de diversas forças atractivas, tanto de ordem física como química, forças essas que têm de ser superadas de forma a quebrar esses ditos aglomerados [54].

A dispersão e desaglomeração por ultra-sons resulta da ocorrência de mecanismos de cavitação ultra-sónica. Isto é, quando aplicados ultra-sons a líquidos, nos quais estão presentes os materiais que queremos homogeneizar, são geradas ondas que alternam entre fases de alta-

pressão (compressão) e de baixa-pressão (rarefacção), responsáveis pelos processos de quebra de ligações entre partículas e consequentemente a uma maior homogeneidade da mistura [53].

4.1.4- Microscopia electrónica de varrimento (SEM)

A técnica SEM (Scanning Electron Microscopy), ou em português, microscopia electrónica de varrimento (MEV), baseia-se na interpretação das interacções entre um dado feixe de electrões altamente energético e a respectiva amostra em estudo, para desta forma se extraírem informações relativas à sua morfologia/topografia. Esta técnica possibilita observar e caracterizar materiais homogéneos/heterogéneos, orgânicos ou inorgânicos a uma escala nanométrica, devido à sua grande profundidade de campo. Esta técnica quando comparada com a microscopia óptica apresenta um muito maior poder de ampliação e de resolução.

Como anteriormente referido, o princípio físico do funcionamento do SEM assenta na incidência de um feixe de electrões altamente acelerados/energéticos na superfície de uma dada amostra que pretendamos estudar, electrões estes que irão interagir com a matéria gerando um conjunto de sinais distintos (electrões secundários, electrões retrodifundidos, electrões de Auger, raios X característicos e fotões de variadas energias) que são captados por detectores específicos. Esses detectores convertem os sinais em sinais eléctricos, que ao terem intensidades diferentes, modelam a intensidade do feixe de electrões responsável pela formação de imagem no tubo de raios catódicos.

Para efeitos de formação de imagem, os electrões secundários e os retrodifundidos são os de maior relevância, uma vez que são estes que interagem com a superfície da amostra (pouca penetração).

As energias tipicamente envolvidas no feixe de electrões variam entre 0.5KeV e 50KeV sendo que a intensidade da emissão depende da própria natureza química da amostra que se pretende estudar. Materiais com electrões pouco ligados emitem melhor que materiais com esses mesmos electrões fortemente ligados. Por este mesmo facto, no estudo de materiais cerâmicos (inorgânicos), é necessário revestir a superfície da amostra em estudo por finas películas de metal.

Associado ao SEM, encontra-se uma ferramenta de análise EDS (Energy Dispersive X-ray analyse), a qual permite determinar a composição química elementar de uma determinada área da amostra [55].

4.1.5- Corrente de carga/descarga isotérmica (ICC/IDC)

A técnica de ICC/IDC (Isothermal Charging/Discharging Current), ou em português, corrente isotérmica de carga/descarga, permite o estudo da distribuição de carga e dipolos eléctricos, em materiais pouco condutores.

Os fenómenos observados ocorrem devido à sensibilidade da orientação molecular de dipolos ligados, e de cargas livres (protões, iões e electrões) ao campo electromagnético ou electrostático externo. Ou seja, a orientação de um sistema de dipolos e de distribuição de cargas é caracterizado por um certo modo de resposta/relaxação durante a aplicação do campo eléctrico e após a aplicação do campo, relacionados com a estrutura e distribuição espacial específica de carga para o material em estudo. As características destas respostas e, portanto, das correntes de carga e descarga, estão intimamente relacionadas com o tempo e a temperatura de relaxação característicos dos dipolos (cargas ligadas que causam relaxação dipolar), cargas espaciais e cargas livres (iões, protões e electrões que fornecem relaxações de corrente directa (DC)). Existem também fenómenos interfaciais, como relaxação de carga relacionada com os mecanismos de Maxwell-Wagner-Sillars (MWS) associados à polarização nas interfaces, que contribuem para o perfil temporal da ICC/IDC.

Numa fase inicial, é aplicado à amostra um campo eléctrico DC (E_p), a uma determinada temperatura (temperatura de polarização, T_p), durante um certo tempo (tempo de carga, t_c), que deverá ser suficientemente longo para que a corrente de carga atinga o valor próximo da saturação, que é garantia de que os processos transientes como os processos mais lentos de carga/polarização das espécies envolvidas ocorreram de forma quase completa. Durante este t_c , o valor de corrente de carga (ICC) é registado.

Findo este tempo t_c , o campo aplicado é retirado (E_0) e a corrente de descarga é registada (IDC) por um período de tempo (tempo de descarga, t_{de}), mais longo que t_c . Durante este processo, é esperado que a polarização/carga devido ao alinhamento dos dipolos e à acumulação de carga nas interfaces e armadilhas (*traps*) desapareça quase completamente, permitindo que por análise das correntes medidas se tirem relações sobre os efeitos da polarização/carga.

O tempo t_{de} , deve ser superior ao t_p , uma vez que se este não for suficientemente longo, apenas as cargas/dipolos menos estáveis são removidas/desalinhados. Desta forma, aumentando t_{de} fará com que se possa eliminar a carga de relaxação rápida (cargas menos estáveis) e também as cargas mais profundas em *traps* mais estáveis que têm associados tempos de relaxação maiores.

A forma e valores obtidos por ICC e IDC registados por um electrómetro de elevada precisão permite-nos tirar conclusões quanto ao comportamento eléctrico e dieléctrico do material em estudo, e perceber melhor o seu comportamento quando sujeito a mecanismos de carga/polarização e descarga/despolarização. De seguida na Figura IV.1 é apresentado um esquema representativo das medidas obtidas por ICC/IDC [57].

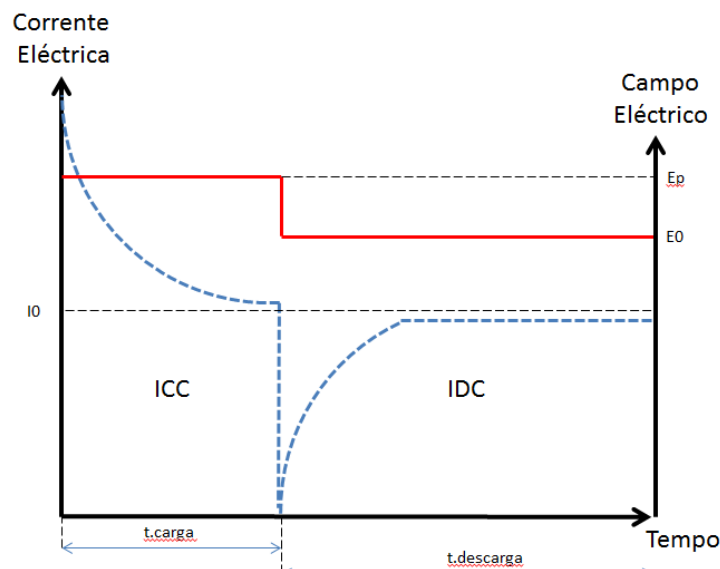


Figura IV.1- Esquema representativo dos campos eléctricos aplicados e respectivos tempos (vermelho). Espectro típico dum ICC/IDC (tracejado azul).

4.1.6- Corrente de descarga termicamente estimulada (TSDC)

A técnica TSDC (Thermally Stimulated Discharge Current), ou em português, corrente de descarga termicamente estimulada, é utilizada como uma poderosa ferramenta no estudo das capacidades e características eléctricas dos materiais isolantes. Com este intuito, o setup de um equipamento de TSDC permite submeter o material em estudo a variações de grande amplitude de temperatura e polarização.

Os fenómenos observados por esta técnica são semelhantes aos do ICC/IDC, sendo que no TSDC os fenómenos são também termicamente estimulados.

A técnica de TSDC permite o estudo duma grande variedade de materiais sem para tal ser necessária uma preparação prévia do mesmo, dada a existência de eléctrodos capazes de se adaptar a um também muito variado leque de formas e feitios. Devido a este mesmo facto, o TSDC surge como uma técnica prática no estudo eléctrico dos materiais.

Na prática, esta técnica consiste na polarização uniforme de uma amostra pela aplicação a uma dada temperatura de polarização (T_p) um campo eléctrico DC (E_p), durante um determinado tempo (t_p) suficientemente grande para permitir que as espécies eléctricas móveis se orientem em conformidade com o campo eléctrico que lhes está a ser aplicado. Após o tempo t_p , é atingida uma configuração específica constante no tempo e procede-se ao arrefecimento rápido da amostra (ainda com o campo aplicado), permitindo o “congelamento” da configuração até uma temperatura suficientemente baixa (T_0), de maneira a que a esta mesma temperatura, a mobilidade das unidades móveis seja considerada nula. Quando atingida a temperatura T_0 , o campo é desligado (E_0) e a amostra é deixada em repouso por um período nunca inferior ao dobro do t_p (t_0), para que se possa eliminar a carga espacial de rápida relaxação, permitindo a estabilização da amostra à T_0 em que os fenómenos mais lentos ainda não tiveram tempo de ocorrer e só serão activados quando for atingida a temperatura característica.

Numa última fase, após decorrido t_0 , procede-se a um incremento constante da temperatura, até valores superiores à T_p . Aquecimento durante o qual nos é possível visualizar o retorno ao equilíbrio das anteriormente referidas espécies móveis, que tinham sido deslocadas e orientadas, através da observação de uma corrente de despolarização/descarga, registada por electrómetro de elevada precisão. Este procedimento encontra-se esquematizado na Figura IV.2.

A técnica TSDC resulta numa frequência equivalente relativamente baixa (na ordem dos 10^{-4} Hz), permitindo a medição de fenómenos com tempos característicos longos, activando-os às temperaturas características. Esta técnica tem a capacidade de obter valores com uma boa resolução e sensibilidade, sendo capaz de medir correntes muito baixas (na ordem dos 10^{-15} A). A utilização desta técnica, baseia-se no facto de todos os materiais serem susceptíveis a polarização/carga (em graus muito distintos), uma vez que a sua respectiva nuvem electrónica atómica e molecular é sensível à aplicação de campos electromagnéticos ou electrostáticos externos, bem como por campos produzidos por átomos ou moléculas vizinhas.

Este procedimento é válido para sistemas caracterizados por possuírem energias de activação, como orientações de dipolos e cargas espaciais. Se posteriormente, esse mesmo sistema for aquecido, então os dipolos individuais, ou aglomerados e estruturas contínuas “descongelam” e como referido, a despolarização irá acontecer a temperaturas características. Mudanças na mobilidade das diferentes espécies do sistema podem ser registadas pela corrente de descarga não isotérmica, causadas maioritariamente pela rotação dipolar de relaxamento, até ao aparecimento da relaxação DC causada pelos iões e electrões móveis e pela libertação de cargas retidas em “armadilhas” (*traps*) resultantes do processo de aplicação de um campo eléctrico. Sendo os processos de relaxação sensíveis a características químicas e físicas, para

cada mecanismo de polarização distinto, um pico característico de corrente é passível de ser medido. É partindo deste mesmo pico, da sua respectiva posição na escala de temperatura, bem como da sua intensidade e largura, que se obtêm conhecimentos relativamente a determinados parâmetros dinâmicos e termodinâmicos do material em estudo [51].

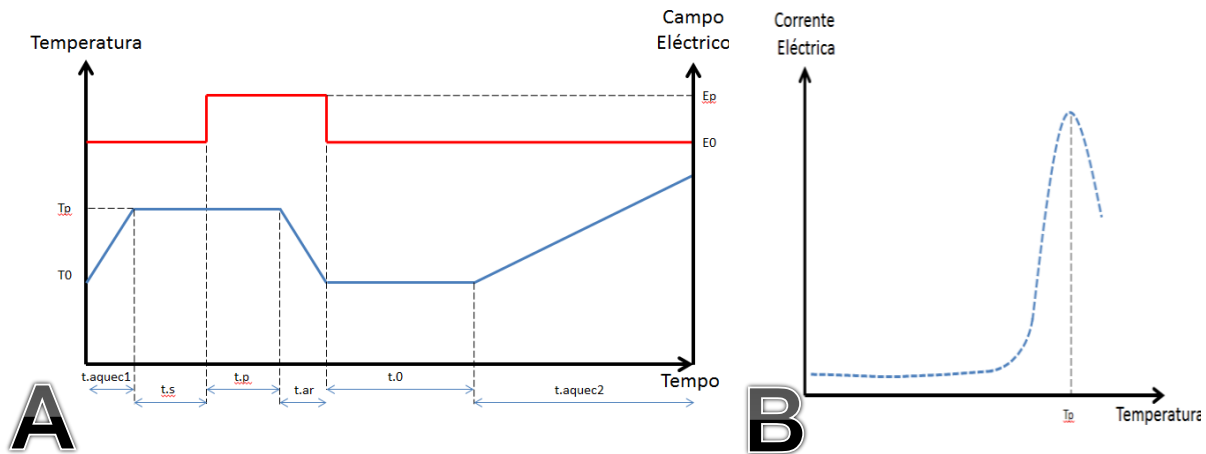


Figura IV.2- A- Esquema representativo do campo eléctrico DC aplicado (vermelho), respectivos tempos e variações de temperatura (azul). B- Espectro típico dum ICC/IDC (tracejado azul).

4.1.7- Espectroscopia no Ultra-Violeta/Visível

A espectroscopia no ultra-violeta/visível consiste numa técnica de caracterização óptica assente na capacidade que os materiais têm de absorver radiação com comprimentos de onda específicos.

Durante o processo de absorção de radiação, parte da energia dos fotões é transferida para os átomos, provocando determinadas transições electrónicas associadas a transições vibracionais e rotacionais específicas de cada material [56,57].

Tendo em consideração que os níveis energéticos atómicos são quantizados, a absorção de energia é um processo específico intimamente relacionado com a estrutura da espécie absorvente, a qual determina a energia envolvida na transição, e a probabilidade de que esta ocorra [56].

A intensidade da absorção não é directamente mensurável, porém é possível determinar a atenuação da radiação incidente na amostra e relaciona-la com a concentração da espécie absorvente. Quando um feixe monocromático atravessa uma solução contendo uma espécie absorvente, parte da energia incidente é absorvida pela amostra. Denomina-se de potência radiante à quantidade de energia transportada por segundo através de uma secção transversal.

A razão entre potência da radiação incidente (P_0) e a potência da radiação emitida (P) é denominada de transmitância (T), esta relação está representada na equação seguidamente representada [58]:

$$T = P/P_0 \quad (\text{Equação IV.2})$$

O processo de absorção é regido pela Lei de Lambert-Beer, que estabelece a relação entre a absorvância (A) e a transmitância da seguinte forma [58]:

$$A = -\log(T) = \varepsilon * b * c \quad (\text{Equação IV.3})$$

onde, $\varepsilon = (4\pi k)/(\lambda)$, em que

$k \rightarrow$ coeficiente de extinção

$b \rightarrow$ distância percorrida pela luz ao longo do corpo

$c \rightarrow$ concentração da suspensão

Podendo a concentração ser calculada fazendo [58]:

$$c = (-\log(T)) / (\varepsilon * b) \quad (\text{Equação V.4})$$

4.1.8- Espectroscopia de relaxação dielétrica (DRS)

A técnica DRS (Dielectric Relaxation Spectroscopy), ou em português Espectroscopia de Relaxação Dielétrica, possibilita o estudo da interação entre um campo elétrico AC e um material.

A polarização resultante da aplicação do campo elétrico AC, é expressa tanto pela permissividade $\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega)$, como pela condutividade $\sigma^*(\omega) = \sigma'(\omega) - i\sigma''(\omega)$, ambas em função da frequência ou de um espectro de impedância (Z), que caracteriza as flutuações de densidade de carga que acontecem na amostra em amplitude e no tempo. Estas flutuações surgem pela reorientação de momentos dipolares permanentes de moléculas individuais ou de rotações dipolares de moléculas flexíveis (polímeros). Outros mecanismos possíveis incluem o transporte de iões ou o aparecimento de cargas na interface de sistemas heterogêneos.

Os processos dinâmicos descritos são passíveis de observação por espectroscopia dielétrica numa gama de frequências compreendida entre $10^{-6} - 10^{15}$ Hz.

4.1- Técnicas de caracterização/preparação das amostras

Esta técnica apresenta uma grande contribuição na caracterização eléctrica (nomeadamente nas propriedades dieléctricas) de materiais não condutores ou semi-condutores e distingue-se das outras técnicas espectroscópicas, como por exemplo a técnica de RMN, por ser especialmente sensível a interacções intermoleculares [59].

4.2- Procedimento experimental

Na persecução do estudo da influência na bioactividade da adição de materiais piezoelétricos (BaTiO_3) a hidroxiapatite para implantes ósseos, os procedimentos experimentais realizados no decorrer do respectivo estudo, respeitaram os seguintes procedimentos Figura IV. 3:

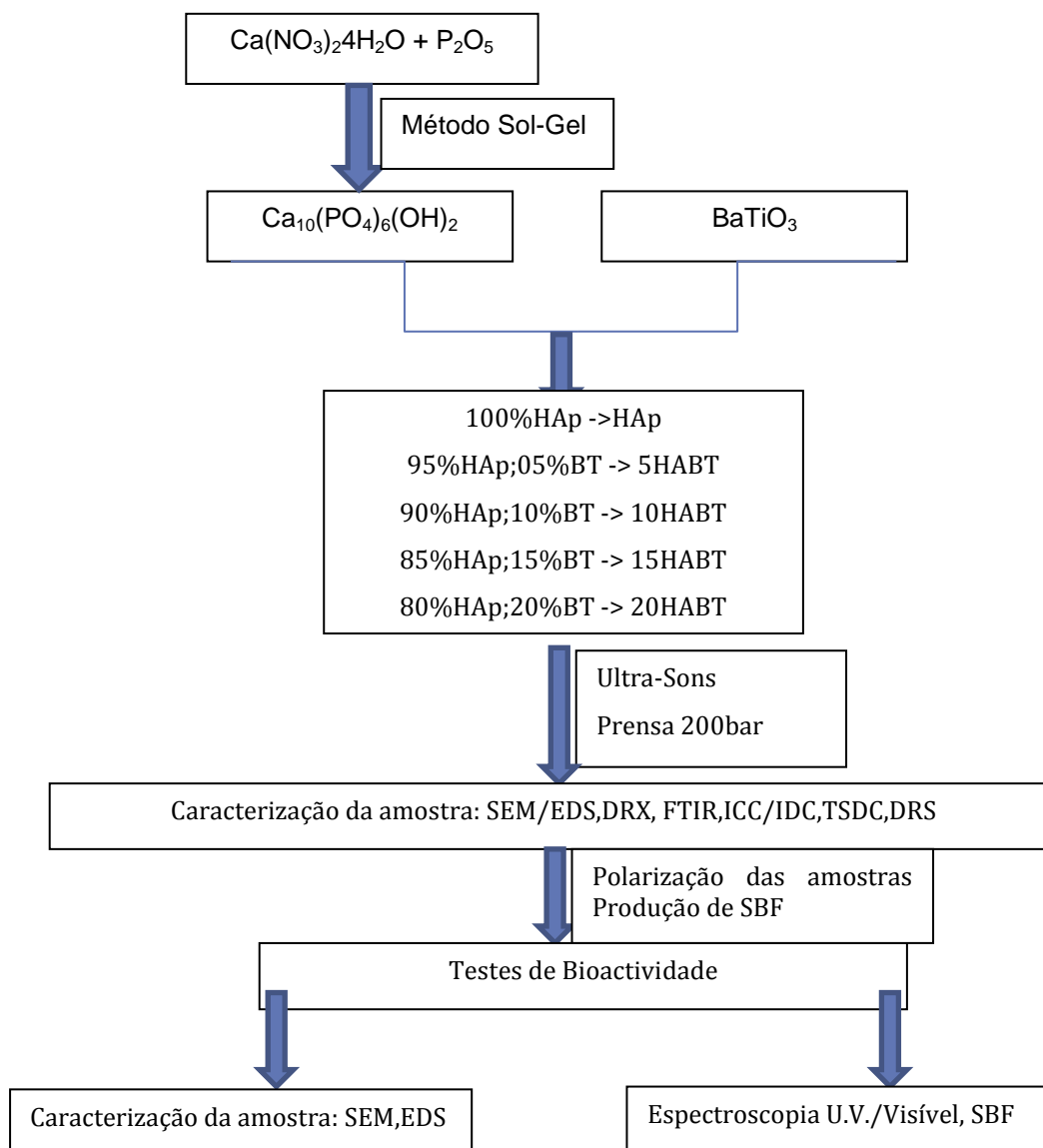


Figura IV. 3- Esquema resumo representativo do procedimento experimental.

4.2.1- Síntese das amostras

4.2.1.1- Síntese de pós de HAp pelo método Sol-Gel

Para a síntese de pós nanométricos de HAp de razão molar de Ca/P=1.67 utilizando o método Sol-Gel, seguiu-se o procedimento abaixo descrito:

Reagentes

- Etanol absoluto: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, Panreac, pureza-99.5%;
- Nitrato de Cálcio Tetrahidratado: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Panreac, pureza-99% \leq ASC \leq 103%;
- Pentóxido de fósforo: P_2O_5 , Sigma-Aldrich, pureza ASC \geq 98%.

Procedimento experimental:

- Pesaram-se 3.55g de pentóxido de fósforo e 19.73g de nitrato de cálcio;
- Numa hotte, dissolveu-se o pentóxido de fósforo e o nitrato de cálcio anteriormente pesados em gobelets individuais com 50ml de etanol;
- Cada uma das soluções foi deixada a agitar por 15m, recorrendo-se a agitadores magnéticos;
- Num terceiro gobelet foi misturado o conteúdo dos outros dois e mais uma vez por um período de 15m a nova solução foi agitada;
- Após este período de agitação, o gobelet com a solução foi colocado em banho de glicerina a uma temperatura constante de 100°C. Passado 1h30m, começou-se a formar o gel, findo 10m do começo deste processo todo o etanol líquido visível tinha evaporado;
- O gel agora obtido foi colocado em estufa a 80°C durante um período de 24h com o objectivo de se tentar extrair o mais possível de etanol ainda presente no gel;
- Após o período de secagem, triturou-se o gel até se obter um pó bastante fino que posteriormente foi colocado em cadinhos. Cadinhos esses que foram colocados num forno, sujeitos a um aquecimento de 5°C por minuto até os 600°C, temperatura na qual permaneceram durante 30m. Após este período, procedeu-se ao arrefecimento dos pós de HAp até à temperatura ambiente.

Após a produção dos pós, recorrendo a um almofariz e pilão, o pó obtido é esmagado até ficar com uma consistência muito fina.

4.2.1.2- Dispersão de pós por ultra-sons

Para cada uma das proporções desejadas do compósito HABT procedeu-se à pesagem individual dos seus constituintes, tendo-se posteriormente colocado num recipiente de vidro os dois pós juntamente com 5mL de etanol. Utilizando o aparelho de ultra-sons UP400S da Hielscher durante 2m, procedeu-se à homogeneização da mistura.

Os parâmetros utilizados foram os seguintes Tabela IV. 2:

Tabela IV. 2- Tabela com os parâmetros utilizados durante o processo de sonificação da mistura a homogeneizar.

Parâmetro	Valores
Ciclo	0.5
Frequência	75%

Após o período de aplicação de ultra-sons, deixa evaporar-se o etanol à temperatura ambiente.

4.2.1.3- Produção de pastilhas (amostras)

Recorrendo a uma balança, são pesados 0.1g dos pós com os quais pretendemos fazer uma pastilha.

- Hap sintetizada através do método sol-gel;
- Titanato de Bário: Barium Titanate (IV)-BaTiO₃, Sigma-Aldrich, powder<2µm, 99,9% pureza.

Estes são colocados no molde SPECAC com 13mm de diâmetro, que é então submetido a uma pressão constante de 200bar (relativamente à pressão atmosférica) durante 30m, utilizando uma prensa existente no laboratório de materiais electroactivos. São formadas pastilhas com um diâmetro de 13mm, espessura de 0.5mm e com um peso de 0.1g. Para efeitos de estudo, foram sintetizadas as seguintes amostras/pastilhas:

1. 100% HAp: HAp
2. 95% HAp e 5% BT: 5HABT
3. 90% HAp e 10% BT: 10HABT
4. 85% HAp e 15% BT: 15HABT

5. 80% HAp e 20% BT: 20HABT

4.2.2- DRX

As pastilhas dos materiais a estudar foram caracterizadas pelo aparelho de DRX X'Pert Pro do fabricante PANalytical. Os ângulos de varrimento para a análise de amostras foram definidos tendo em atenção a posição dos picos de maior intensidade para os materiais esperados.

Para a caracterização da amostra de HAp foi efectuada uma análise angular no intervalo de $0^\circ < 2\theta < 65^\circ$. Para caracterização da amostra contendo apenas BT, como da amostra 20HABT foi efectuada uma análise angular no intervalo de $0^\circ < 2\theta < 75^\circ$.

Para todas as amostras estudadas, foram efectuadas um total de 8 análises de 10 minutos a cada uma das temperaturas e tempos abaixo representados na Figura IV. 4

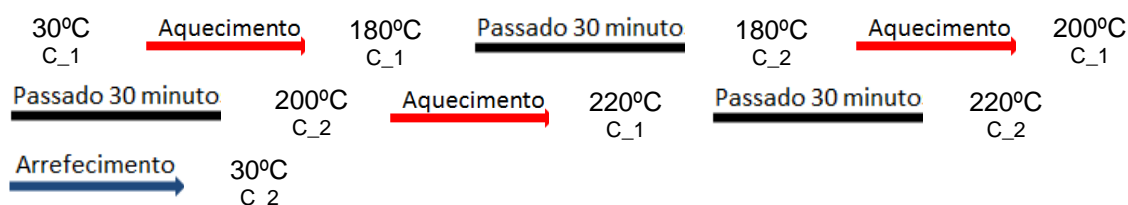


Figura IV. 4- Esquema explicativo das medições de DRX efectuadas às amostras.

Para análise dos espectros foi utilizado o software X'Pert HighScore Plus versão 2.2e, que utiliza a base de dados ICSD(*INORGANIC CRYSTAL STRUCTURE DATABASE*).

4.2.3- FTIR

A técnica de caracterização FTIR foi utilizada para identificar os diferentes grupos funcionais existentes nas seguintes amostras:

- Pastilha de 1,3cm de diâmetro com 0.002g de HAp sintetizada pelo método sol-gel e 0.198g de KBr.
- Pastilha de 1,3cm de diâmetro com 0.002 de BT e 0.198g de KBr.
- Pastilha de 1,3cm de diâmetro com 0.0016g de HAp sintetizada pelo método sol-gel, 0.004g BT e 0.198g de KBr.

Para tal recorreu-se ao espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet 6700 FTIR existente nas instalações do CENIMAT/i3N, efectuando-se um varrimento espectral nas amostras de 4000cm^{-1} a 400cm^{-1} , obtendo-se um espectro que reflecte a transmitância em função do número de onda.

4.3.4- SEM/EDS

A técnica de SEM foi utilizada para visualizar e analisar quimicamente a superfície de pós e de pastilhas produzidas, utilizando para tal um Microscópio Electrónico de Varrimento Carl Zeiss Auriga Crossbeam SEM-FIB workstation existente no CENIMAT/i3N. Para tal técnica poder ser utilizada, todas as amostras foram revestidas superficialmente por uma fina película de ouro (metal bom condutor).

4.3.5- ICC/IDC

Para a execução das técnicas de ICC/IDC, as pastilhas foram colocadas entre dois eléctrodos de cobre ligados a uma fonte de tensão DC, no interior de uma câmara que possibilitava a variação de temperaturas, enquanto as medições das correntes eram feitas recorrendo a um electrómetro KEITHLEY 617. O electrómetro encontra-se ligado a uma placa de aquisição por sua vez ligada a um computador, enquanto o controlador de temperatura está directamente ligado ao mesmo computador, permitindo desta forma o controlo da temperatura e o registo simultâneo de temperatura e corrente.

Para efeitos de análise, foram seleccionadas pastilhas de HAp, 10 HBT e de 20 HBT. Tendo estas sido sujeitas a diferentes intensidades de campo DC a diferentes temperaturas.

4.3.6- TSDC

Como mencionado da descrição da técnica, o TSDC utiliza a mobilidade molecular como forma de medição, sendo particularmente eficaz para o estudo de materiais polares.

A execução desta técnica encontra-se resumida na Figura IV.2. Importante referir que após t_0 , procede-se ao aquecimento da amostra até 250°C a uma taxa constante ($2^\circ\text{C}/\text{m}$), durante o qual, o retorno ao equilíbrio das entidades previamente orientadas, é responsável por gerar

uma corrente de despolarização que vai sendo registada em função do aumento constante da temperatura.

Para se proceder à análise por TSDC, as pastilhas foram colocadas numa câmara, que possibilitava variações de temperatura e de polarização, enquanto as medições das correntes eram feitas recorrendo a um electrómetro KEITHLEY 617. O electrómetro encontra-se ligado a uma placa de aquisição por sua vez ligado a um computador, enquanto o controlador de temperatura está directamente ligado ao mesmo computador, permitindo desta forma o registo simultâneo de temperatura e corrente.

4.3.7- Síntese do SBF

Estudos demonstraram que SBF's, com concentrações iónicas semelhantes ao do plasma sanguíneo, são capazes de reproduzir com relativa fiabilidade as mudanças que ocorreriam em materiais sob condições *in vivo*. Daí a importância do desenvolvimento de um SBF que consiga reproduzir ao máximo possível estas mesmas condições. [60,61]

Para efeitos da realização de testes de bioactividade, foi seleccionada a 27-Tris-SBF, desenvolvida por A. Cuneyt Tas e por Defne Bayraktar [62,63], por ser aquela que apresenta uma melhor relação entre estabilidade (tempo de preservação) e concentrações iónicas mais semelhantes às do plasma sanguíneo. A respectiva concentração iónica encontra-se representada na Tabela IV. 3.

Tabela IV. 3- Concentrações iónicas, em mM e pH da solução SBF e do plasma sanguíneo. Adaptado de Tas et al, (2000) [56].

	Concentração dos Iões em mM								pH
	Na ⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	
Plasma Sanguíneo Humano	142	103	27	5	1.5	2.5	1.0	0.5	7
27-Tris-SBF	142	125	27	5	1.5	2.5	1.0	0.5	7

Para síntese do 27-Tris-SBF, seguiu-se o protocolo descrito por Jalota et al. [64] havendo o cuidado de todos os testes a realizar, terem sido executados no prazo máximo de 30 dias após ter sido feito o SBF.

4.3.8- Ensaios de bioactividade

Neste trabalho foram realizados testes de bioactividade a amostras de HAp, 5HABT e de 20HABT com o intuito de se aferir sobre a capacidade de promoção de precipitação de apatites por parte das mesmas. Para a realização dos testes de bioactividade foi utilizada uma solução simuladora do fluido corporal (27-tris-SBF).

Os testes foram realizados a três tipos distintos de amostras acima supracitados durante 9 períodos temporais distintos: 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 72h, 1 semana e 2 semanas. Para cada um destes tempos e amostras, foram utilizadas amostras polarizadas e não polarizadas (para efeitos de controlo).

As condições de polarização utilizadas para todas as amostras são as seguintes:

1. Aquecimento até 200°C a uma taxa de 5°C/m.
2. Manutenção da amostra a 200°C por 1 hora.
3. Polarização sob acção de um campo de 10kV/cm durante 1 hora.
4. Arrefecimento até à temperatura ambiente, à qual se desligou o campo aplicado.
5. Findo 2 horas do campo desligado, as amostras foram colocadas para ensaios de bioactividade.

Durante os testes de bioactividade, cada uma das amostras foi colocada em recipiente de vidro juntamente com 10mL de SBF numa estufa a 37°C.

Decorrido o tempo pré-estabelecido para cada um dos testes, as amostras foram retiradas do SBF, lavadas com água purificada e colocadas a secar na mesma estufa a 37°C. As soluções de SBF foram isoladas do ambiente externo e colocadas num frigorífico a 3°C.

Durante os períodos de testes e de armazenamento das soluções de SBF, os recipientes de vidro foram sempre devidamente selados para o seu conteúdo estar devidamente isolado da atmosfera, de forma a evitar possível evaporação de água existente no SBF e consequente influência nos resultados obtidos.

4.3.9- Espectroscopia no U.V./Visível

Para determinação das concentrações de cálcio e de fósforo nas soluções de SBF, foi utilizado o procedimento descrito no kit de referência 1001061 e 1001150 respectivamente, da empresa SPINREACT. Para medição da absorvância das soluções a testar, foi utilizado o aparelho de T90+ U.V./VIS Spectrometer da marca PG Instruments. O software utilizado para análise foi o UVWin Lab V.5.2.0.

4.3.10- DRS

As medidas de relaxação dielétrica foram realizadas em atmosfera de ar e foram realizadas no Departamento de Química da FCT-UNL recorrendo a uma ponte de medidas de impedâncias NovoControl GmbH Alpha-N, um controlador de temperatura NovoControl-GmbH Quatro e um criostato BDS-1100 com exactidão de 0.1K. A gama de frequências nestas medidas dieléctricas foi de 1-10⁶Hz, num intervalo de temperaturas entre os 298.15K (25°C) e os 523.15K (250°C). Cada amostra foi submetida a dois ciclos de aquecimento.

V-Apresentação/discussão dos resultados experimentais

5.1- DRX

5.2- FTIR

5.3- ICC/IDC

5.4- TSDC

5.5- SEM/EDS

5.6- Espectroscopia no U.V./Visível

5.7- DRS

5.1- DRX

Na Figura V. 1 encontra -se representado o difractograma obtido para os pós de HAp obtidos através do método sol-gel. A fim de inferir sobre possíveis alterações de estrutura, foram efectuadas análises de DRX a temperaturas consideradas relevantes para a polarização efectuada e respectiva aplicabilidade biológica.

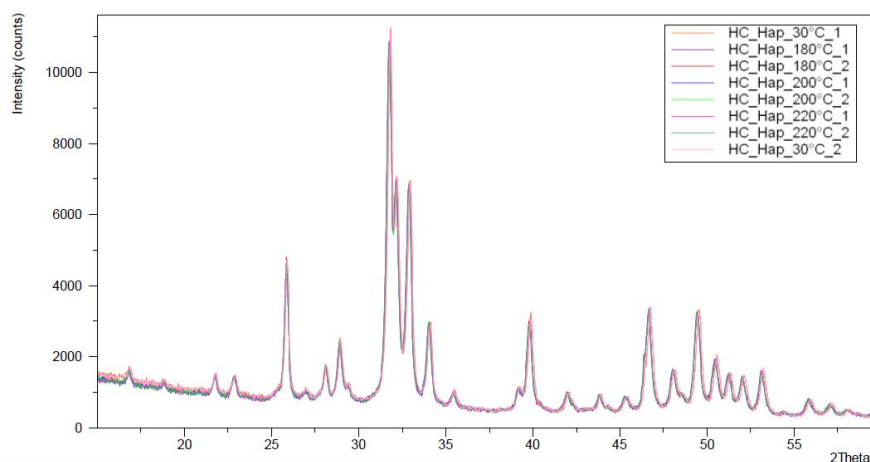


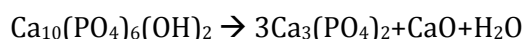
Figura V. 1- Difractograma obtido para uma pastilha de HAp utilizando os pós obtidos através do método sol-gel, para diferentes temperaturas.

Pela análise do difractograma a diferentes temperaturas e mediante a utilização do software X'Pert HighScore Plus versão 2.2e, de acordo com a base de dados ICSD(*INORGANIC CRYSTAL STRUCTURE DATABASE*), foi possível identificar o material com as seguintes características (Figura V. 2):

Código de Referência:	98-010-5031
Nome Mineral:	Hydroxyapatite
Nome Químico:	Calcium Phosphate(V) Hydroxide (5.1/3/0.9)
Fórmula Química:	$H_{0.894}Ca_{5.1}O_{12.894}P_3$
Fórmula Química Secundária:	$Ca_{5.1}(PO_4)_3(OH)_{0.894}$
Parâmetros Cristalográficos	
Sistema Cristalino:	Hexagonal
Grupo Espacial:	P 63/m
a (Å):	9.4210; b (Å): 9.4210; c (Å): 6.8970

Figura V. 2- Informação relativa à HAp detectada

Mediante a utilização do referido software, foi também possível inferir a não existência de contaminação da amostra por sub-produtos (ex: CaO e β -TCP). Segundo Fathi et al. e Feng et al., tais contaminações geralmente surgem pela decomposição da HAp a temperaturas elevadas (800°C) e na presença de água, mediante a seguinte reacção [45,46]:



Ainda da análise do difractograma pelo software (informação relativa à largura a meia altura dos picos de difracção), é possível determinar o tamanho do grão do cristalito da HAp através da seguinte fórmula de Scherrer:

$$D_c = \frac{0.9\lambda}{\beta * \cos\theta} \quad (\text{Equação V.1})$$

onde D_c representa a dimensão do cristalito, λ o comprimento de onda dos raios-X ($\lambda=1.5418 \cdot 10^{-10}\text{m}$), β a largura a meia altura do pico de difracção de maior intensidade e o θ o ângulo correspondente ao pico de maior intensidade.

Tendo em mente o interesse da aplicação deste material para efeitos biológicos, seleccionou-se para cálculo da dimensão do cristalito a temperatura de 30°C, antes e após o respectivo aquecimento até 220°C. Contudo, é de referir que a não existência de alterações estruturais da HAp, na gama de temperaturas estudada, significa que o valor do tamanho do cristalito é independente da temperatura a que foi efectuada a análise de DRX. Tal não é de estranhar pois a cristalização da HAp neste sistema sol-gel dá-se a temperaturas acima de 500°C, pelo que após sinterização não é expectável o aparecimento de alterações estruturais para temperaturas abaixo deste valor [45,46].

Tabela V. 1- Medições da dimensão do cristalito a 30°C antes e após aquecimento até aos 220°C.

HAp 30°C _1	HAp 30°C _2
30,2nm	27,7nm

Quanto maior o tamanho do cristalito maior o grau de cristalinidade. Uma das hipóteses explicativas é de que após aquecimento a 220°C, houve alguma libertação de tensão na rede

cristalina com ligeiro rearranjo dos átomos mantendo-se a mesma estrutura cristalina com ligeira diminuição de parâmetros de rede. No entanto, e apesar, a variação registada na Tabela V. 1 não é considerada significativa.

Na

Figura V. 3, encontra-se representado o difractograma obtido para os pós de BT comprados à Sigma-Aldrich. A fim de inferir sobre possíveis alterações de estrutura, foram efectuadas análises de DRX a temperaturas consideradas relevantes para a polarização efectuada e respectiva aplicabilidade biológica.

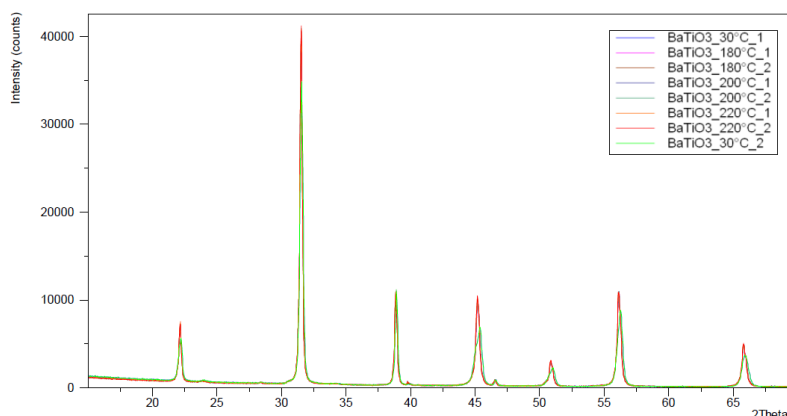


Figura V. 3- Difractograma obtido para uma pastilha de BT, utilizando os pós adquiridos comercialmente para diferentes temperaturas.

Pela análise do difractograma a diferentes temperaturas e mediante a utilização do software X'Pert HighScore Plus versão 2.2e, de acordo com a base de dados ICSD(INORGANIC CRYSTAL STRUCTURE DATABASE) foi possível identificar o material com as seguintes características (Figura V. 4):

<p>Código de Referência: 98-004-1885</p> <p>Nome Químico: Titanato de Bário</p> <p>Fórmula Química: $Ba_1O_3Ti_1$</p> <p>Fórmula Química Secundária: $Ba (TiO_3)$</p> <p>Parâmetros Cristalográficos</p> <p>Sistema Cristalino: Tetragonal</p> <p>Grupo Espacial: $P 4 m m$</p> <p>Space group number: 99</p> <p>a (Å): 4.0070; b (Å): 4.0070; c (Å): 4.0170</p>	<p>Código de Referência: 98-001-1003</p> <p>Nome Químico: Titanato de Bário</p> <p>Fórmula Química: $Ba_1O_3Ti_1$</p> <p>Fórmula Química Secundária: $Ba (TiO_3)$</p> <p>Parâmetros Cristalográficos</p> <p>Sistema Cristalino: Cúbico</p> <p>Grupo Espacial: $P m -3 m$</p> <p>Space group number: 221</p> <p>a (Å): 4.00340; b (Å): 4.0340; c (Å): 4.0340</p>
---	--

Figura V. 4- Informação relativa ao BT detectado

Tendo em mente o interesse da aplicação deste material para efeitos biológicos, seleccionou-se para cálculo da dimensão do cristalito à temperatura de 30°C (antes e após aquecimento até 220°C), como na respectiva temperatura de 220°C após 30 minutos de neste patamar de temperatura.

Tabela V. 2- Medições da dimensão do cristalito depois de 30min à temperatura de 220°C, assim como aos 30°C antes e após o referido aquecimento.

BT 30°C _1	BT 220°C _2	BT 30°C _2
29,8nm	42,3nm	32,9nm

De notar que, acima dos 120°C ocorre a transição do titanato de bário da estrutura tetragonal para a cúbica, estando a variação do tamanho do cristalito de 30°C para 220°C associado a esta mudança estrutural do BT. Após o aquecimento até os 220°C e respectivo arrefecimento para os 30°C, a variação da dimensão do cristalito não é considerada significativa.

Pela análise computacional do respectivo difractograma, pode-se ainda verificar que para temperaturas acima dos 180°C inclusive, se verifica uma mudança de estrutura tetragonal para cúbica. Após arrefecimento, não se consegue identificar nenhuma alteração de estrutura relativamente ao pré-aquecimento.

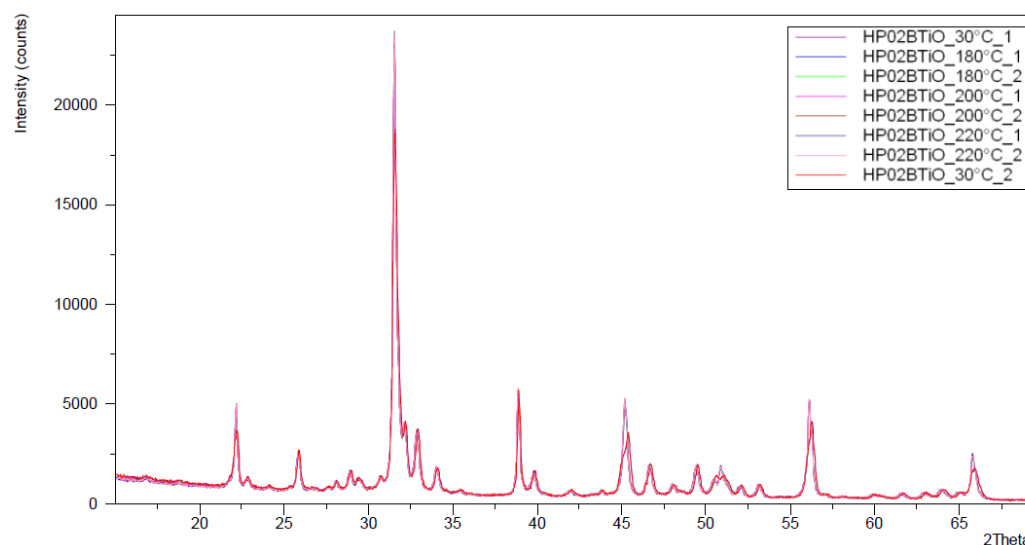


Figura V. 5- Difractograma obtido para a pastilha 20HABT para diferentes temperaturas.

Pela observação do difractograma da Figura V. 5, é possível verificar a presença dos picos característicos de HAp e de BT, semelhante às análises feitas anteriormente, evidenciando portanto uma elevada estabilidade estrutural da amostra 20HABT para as temperaturas analisadas.

Em suma, uma mistura de HAp e BT (20HABT), não provoca uma alteração estrutural nos materiais, pelo que se infere a não existência de reacções químicas entre os dois materiais.

5.2- FTIR

Nas Figura V. 6 e Figura V. 7, encontram-se representados os espectros de FTIR obtidos para a HAp, BT e mistura de ambos (20HABT). Com a análise dos respectivos espectros pretende-se identificar a presença dos grupos funcionais característicos dos materiais, encontrando-se essa mesma referida identificação ilustrada nas supracitas figuras.

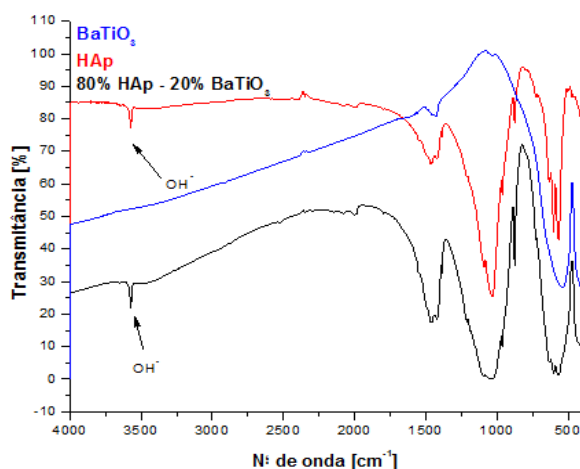


Figura V. 6 - Espectro de FTIR obtido para pastilhas contendo pós de HAp, de BT e combinação de ambos.

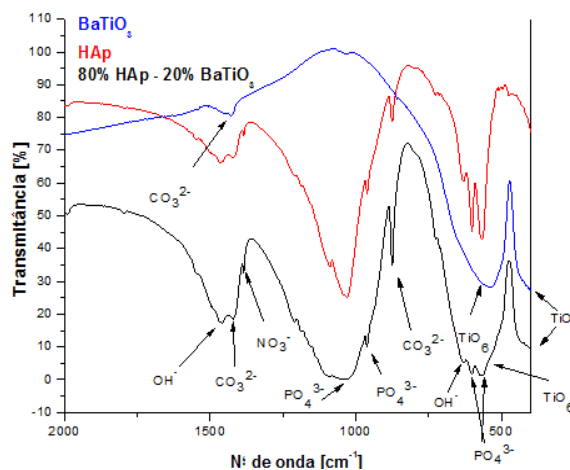


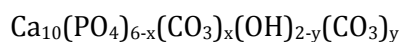
Figura V. 7 – Ampliação do espectro anterior de FTIR na zona de interesse para a identificação das ligações presentes nos dois compostos.

As identificações nas Figura V. 6 e Figura V. 7 foram efectuadas de acordo com modos de vibração FTIR específicos e tabelados para cada um dos materiais [48,51,65,66,67,68,69,70].

Pela observação do espectro de FTIR, é possível aferir que a HAp produzida pelo método Sol-Gel é carbonatada, através da existência de picos relativos a este grupo funcional nos comprimentos de onda de 1480cm^{-1} e de 872cm^{-1} .

A existência de um pico intenso na região de 872cm^{-1} indica a existência de uma forte substituição carbonatada tipo B, ou seja, substituição dos iões fosfato pelos iões carbonato ($\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{CO}_3^{2-}$). A existência de um pico, ainda que de menor intensidade, na região de 1480cm^{-1} sugere a existência de uma hidroxiapatite carbonatada tipo A, ou seja, substituição dos iões hidroxilo pelos iões carbonato ($\text{OH} \rightarrow \text{CO}_3^{2-}$). Infere-se que a HAp produzida é carbonatada tipo AB.

A ocorrência destes dois tipos possíveis de substituição carbonatada, leva a que a fórmula da hidroxiapatite estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, seja na realidade algo similar a:



[71,72]

Pela observação do espectro de FTIR, é também possível verificar que não há deslocamento das bandas características da HAp ou do BT, o que sugere a não existência de qualquer tipo de interacção física entre estes dois materiais, pelo que esta mesma mistura é capaz de incorporar as características específicas de cada um dos seus compostos sem modificações.

5.3- ICC/IDC

No estudo das correntes isotérmicas as amostras de HAp e BT foram polarizadas e despolarizadas, em atmosfera de ar, a diferentes temperaturas, com campos eléctricos DC de diferentes intensidades, de modo a inferir algumas conclusões acerca do comportamento eléctrico destes materiais.

Os estudos incidiram sobre 3 tipos de amostras distintas:

- 100% de HAp (HAp)
- 90% de HAp e 10% BT (10HABT)
- 80% de HAp e 20% BT (20HABT)

A cada uma das amostras na altura de prensagem foi colocada uma folha de alumínio de 1cm de diâmetro por cima e por baixo do pó a prensar. Isto foi feito com o intuito de se conseguir uniformizar a superfície de contacto e melhorar o contacto eléctrico com o eléctrodo do aparelho de ICC/IDC com a amostra.

De forma a melhor ilustrar o processo pelo qual se medem as correntes de carga isotérmicas (ICC durante 1h) e correspondentes correntes de descarga isotérmica (IDC durante 2h), foram seleccionados a título exemplificativo, os períodos de polarização (campo eléctrico DC aplicado) seguido dos respectivos períodos de despolarização (campo eléctrico DC desligado) para duas amostras distintas (HAp e 20HABT), sujeitas a um campo eléctrico DC de intensidade 4 kV/cm^2 a uma mesma temperatura de 80°C , estando os resultados apresentados na Figura V. 8.

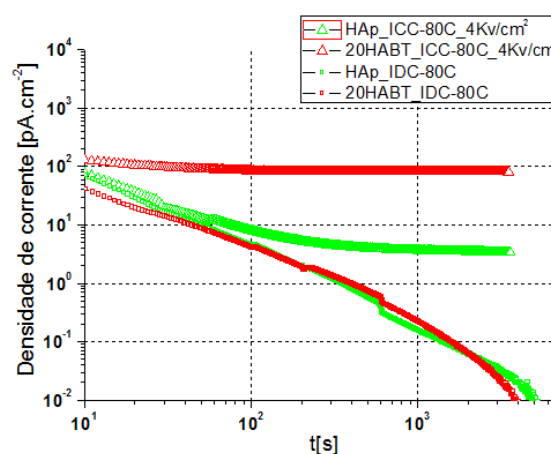


Figura V. 8- Gráfico obtido através da medição de correntes de carga e descargas isotérmicas (ICC/IDC) de uma amostra de HAp e outra de 20HABT sujeitas a um campo eléctrico DC de 4 kV/cm a 80°C por 1h.

O gráfico da Figura V. 8 tem representado correntes de carga (ICC) e de descarga (IDC) de duas amostras distintas, mas sujeitas às mesmas condições de carga/descarga. De sua análise pode-se inferir que em ICC, as correntes registadas são aproximadamente 20 vezes mais elevadas na amostra de 20HABT do que na HAp, podendo-se daqui inferir que tal facto deve estar associado à adição de BT na amostra. Relativamente às correntes de descarga (IDC), os resultados não variam significativamente entre ambas.

Seguidamente optou-se por apresentar e executar uma análise sistemática dos resultados da fase de carga (ICC) separadamente dos resultados da fase de descarga (IDC) para cada uma das temperaturas de 80°C e de 120°C. Foram seleccionadas estas temperaturas por não diferirem muito do ponto de ebulição da água (100°C), tendo-se seleccionado uma temperatura abaixo (80°C) e outra acima (120°C) do referido ponto de ebulição.

5.3.1- Carga/Descarga a 80°C

Numa primeira fase (ICC), as três amostras foram submetidas a três campos eléctricos DC de diferentes intensidades, a uma temperatura constante de 80°C pelo período de 60 minutos. Tendo-se obtido os seguintes resultados da Figura V. 9.

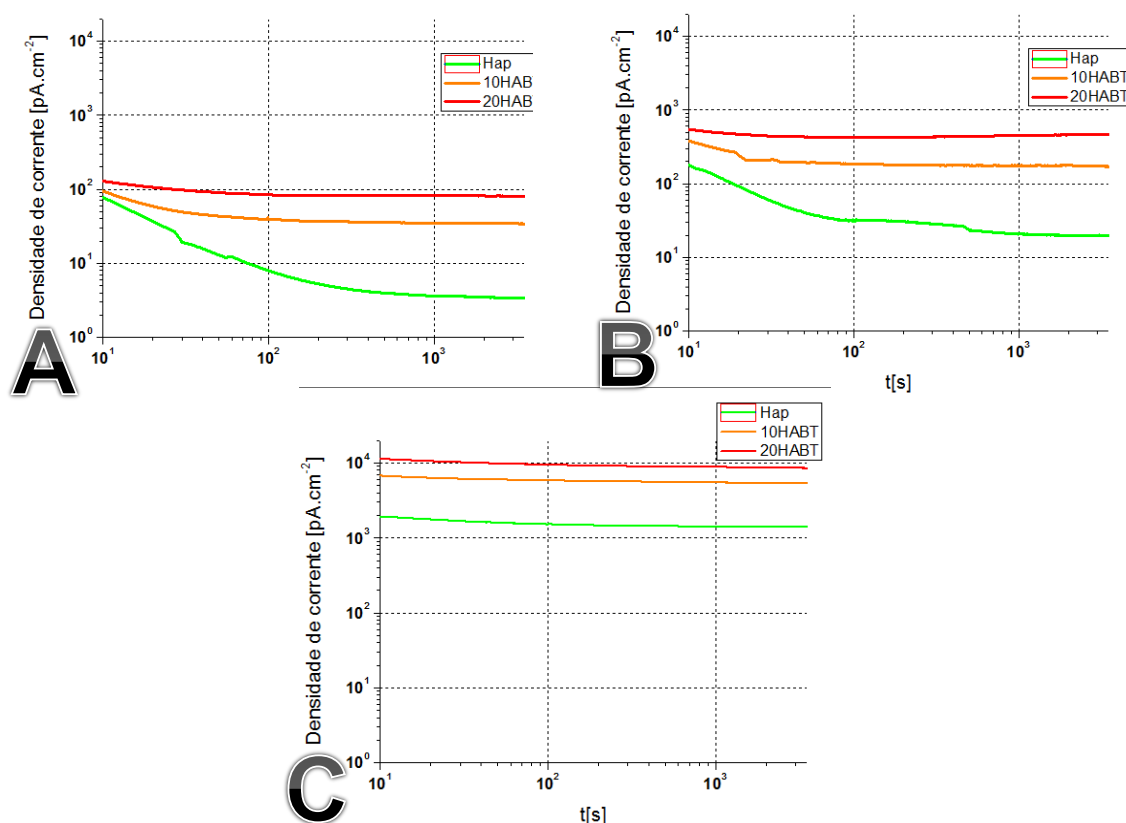


Figura V. 9- Gráficos obtidos através da medição de correntes de carga isotérmicas (ICC), medidas em atmosfera de ar, a 80°C, para as 3 amostras em estudo, sujeitas a um campo eléctrico DC de 4kV/cm (A); 10kV/cm (B); e 20kV/cm (C) de intensidade.

Pela análise dos 3 gráficos da Figura V. 9, verifica-se que quanto maior for a intensidade do campo DC aplicado, maior será a densidade de corrente registada ICC para cada uma das amostras. Sendo que o aumento da densidade de corrente verificado nas amostras é proporcionalmente muito superior ao aumento de intensidade do campo aplicado, pelo que não há uma variação linear da ICC com o valor E_p , colocando em evidência a entrada em acção de mecanismos não-ohmicos activados a valores mais elevados do campo eléctrico.

Também pela análise da mesma Figura V. 9, é possível verificar que independentemente da intensidade do campo aplicado, a amostra de HAp é a que apresenta densidades de corrente mais reduzidas, seguida pela de 10HABT, sendo a amostra de 20HABT a que maior densidade de corrente apresenta. Isto sugere que a 80°C a adição de BT à HAp aumenta o número de dipolos eléctricos presentes levando ao aumento inicial da corrente. Por outro lado fenómenos que, provavelmente ocorrem nas fronteiras dos grãos podem levar a um aumento da corrente a tempos mais longos, e também a uma estabilização mais rapidamente do seu valor, o que pode, por sua vez levar a um aumento da condutividade das amostras.

De notar que a 80°C as densidades de corrente registadas durante a polarização sofrem uma ligeira diminuição numa fase inicial, permanecendo relativamente constantes durante o resto do tempo. Excepção para isto, é a amostra de HAp que para intensidades de campo de 4kV/cm e de 10kV/cm demora mais tempo a atingir a estabilidade. Provavelmente a introdução de dipolos pelo BT podem “esconder” os movimentos mais lentos de cargas e dipolos que ocorrem na Hap.

Esta diminuição inicial de densidade de corrente comum a todas as amostras e mais acentuada na HAp, poderá estar associada ao facto de numa fase inicial imediatamente a seguir à aplicação de um campo DC, haver na amostra um maior movimento de cargas que se orientam e deslocam mais rapidamente, seguindo-se uma fase em que se observa a movimentação de cargas em menor quantidade e mais lentas, que demoram mais tempo a “sujeitar-se” ao campo aplicado.

Numa segunda fase (IDC), foram medidas as correntes das três amostras imediatamente após o campo eléctrico nelas aplicado ter sido desligado, permitindo-nos saber quando é que a corrente existente nas amostras atinge valores próximos de zero. A temperatura foi mantida igual à do período de polarização (80°C) durante 2h. Foram obtidos os seguintes resultados.

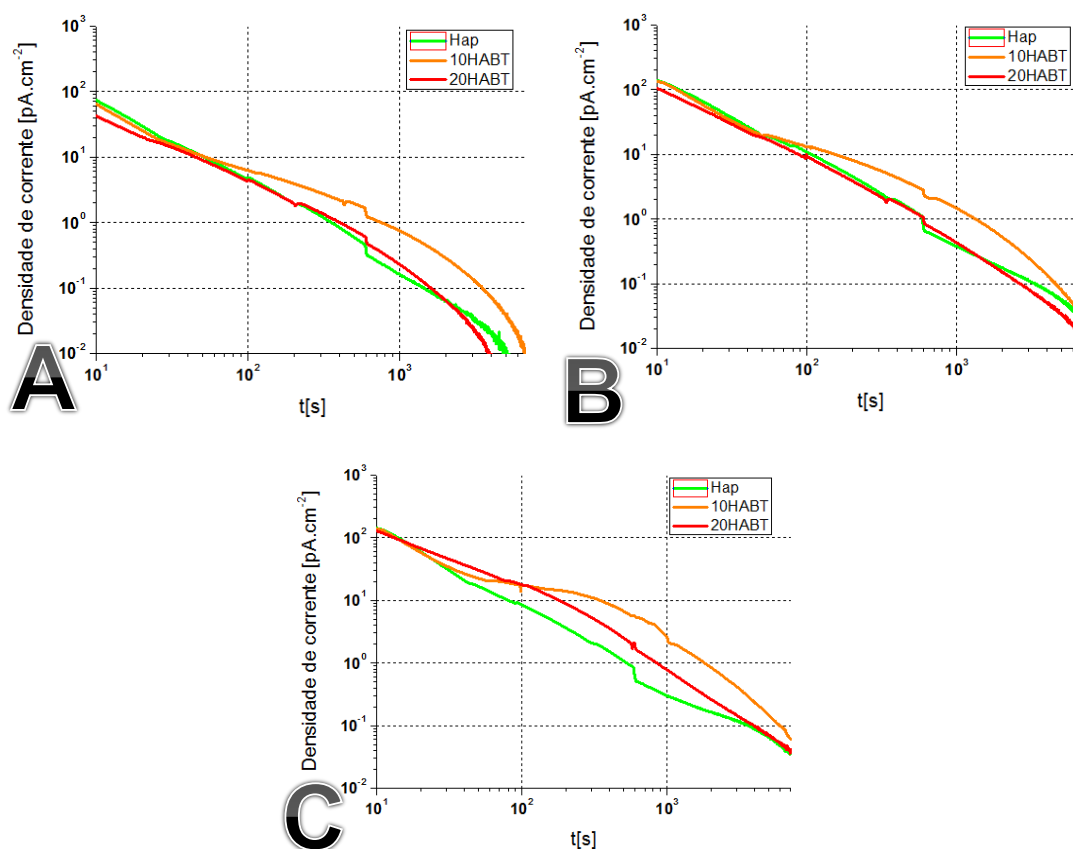


Figura V. 10- Gráficos obtidos através da medição de correntes de descarga isotérmicas (IDC), medidas em atmosfera de ar, a 80°C, para as 3 amostras em estudo, após terem sido sujeitas a um campo eléctrico DC de 4kV/cm (A); 10kV/cm (B); e 20kV/cm (C) de intensidade.

Para as três diferentes intensidades de polarização, as correspondentes densidades de corrente de descarga registam uma diminuição bastante acentuada ao longo do tempo. Contudo, a amostra 10HABT, para tempos mais longos apresenta, consistentemente densidades de corrente mais elevadas. Este comportamento ocorre em outras medidas, por exemplo em 5.3.2., mas com os dados obtidos até este momento, não é possível explicar de forma inequívoca esta diferença observada.

Para a descarga da polarização de 4kV/cm no tempo medido de 2 horas, foi possível verificar que todas atingiram valores de corrente muito próximas do limite de medida do equipamento (para as condições de medição utilizadas, são consideradas ruído). Já para as descargas das polarizações de 10kV/cm e de 20kV/cm, apesar das densidades de corrente registadas também serem muito baixas, os resultados apontam para que a de 20kV/cm consiga permanecer mais tempo com carga do que a de 10kV/cm.

Pelo que, pela análise dos três gráficos da Figura V. 10, é-nos sugerido que quanto maior for a intensidade do campo aplicado durante a polarização, os fenómenos que são activados são em maior número, porque só para estes valores de campo os processos de carga/polarização com energias mais elevadas e também tempos de relaxação mais longos ocorrem, pelo que a densidade de corrente é, não só, mais elevada mas, também é necessário mais tempo para se dar a descarga/despolarização da amostra.

Relativamente à taxa de despolarização, pelos resultados obtidos em Figura V. 10, não nos é possível aferir conclusivamente quanto à influência da composição das amostras na sua despolarização.

5.3.2- Carga/Descarga a 120°C

Tal como anteriormente, numa primeira etapa, as três amostras foram submetidas a campos eléctricos DC de diferentes intensidades, a uma temperatura constante de 120°C pelo período de 60 minutos. Tendo-se obtido os seguintes resultados.

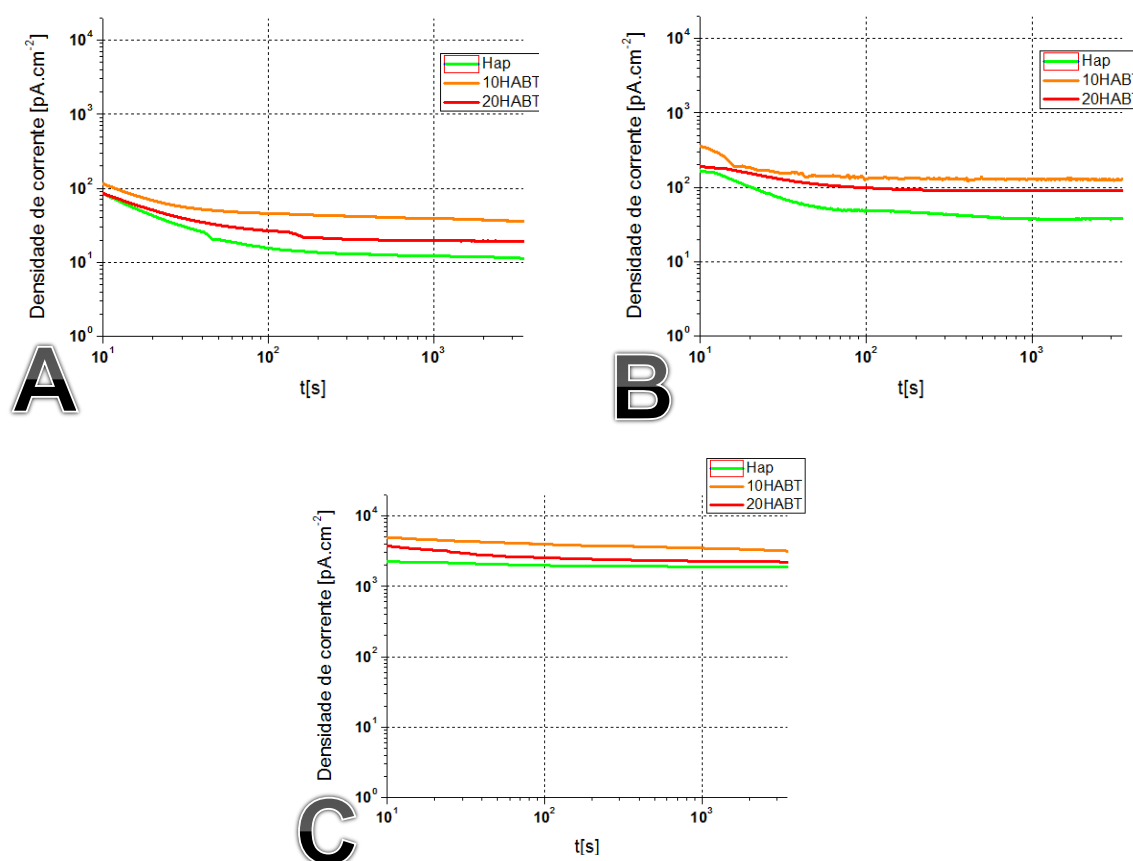


Figura V. 11- Gráficos obtidos através da medição de correntes de carga isotérmicas (ICC), medidas em atmosfera de ar, a 120°C, para as 3 amostras em estudo, sujeitas a um campo eléctrico DC de 4KV/cm (A); 10KV/cm (B); e 20KV/cm (C) de intensidade.

Pela análise dos três gráficos da Figura V. 11, verifica-se que tal como a 80°C, quanto maior for a intensidade do campo DC aplicado, maior será a densidade de corrente registada para cada uma das amostras. Sendo que o aumento da densidade de corrente verificado nas amostras é proporcionalmente muito superior ao aumento de intensidade do campo aplicado, ou seja, mais uma vez, a densidade de corrente não varia de forma linear com o campo aplicado. Tal como a 80°C as densidades de corrente registadas durante a polarização sofrem uma diminuição numa fase inicial que, a tempos semelhantes, passa a ser muito mais lenta tornando-se quase constantes durante o resto do tempo de carga.

Também pela análise da mesma Figura V. 11, é possível verificar que independentemente da intensidade do campo aplicado, a amostra de HAp é a que apresenta densidades de corrente mais reduzidas, seguida pela de 20HABT, sendo a amostra de 10HABT a que maior densidade de corrente apresenta. Esta diminuição da corrente deve estar relacionada com a remoção da água, maior neste caso pelo valor da temperatura a que foram mantidas as amostras ser superior à temperatura de evaporação da água. Ao longo do processo de carga, a diferença de densidades de corrente entre as várias amostras são menores que nas medidas a 80°C Figura V. 9. De notar, também, que 120°C é a temperatura à qual ocorre a transição do titanato de bário da estrutura tetragonal para a cúbica (onde deixa de ser ferroelétrico porque a distribuição de carga passa a ser simétrica). Pelo que, a agora registada diminuição das densidades de corrente ICC a 120°C das amostras 10HABT e 20HABT em relação à Figura V. 9, poderá ser consequência desta transição de estrutura do BT.

Numa segunda fase destas medidas, foram registadas durante 2h as correntes das três amostras desde o instante imediatamente após o campo eléctrico nelas aplicado ter sido desligado. A temperatura foi mantida igual à do período de polarização (120°C). Foram obtidos os seguintes resultados.

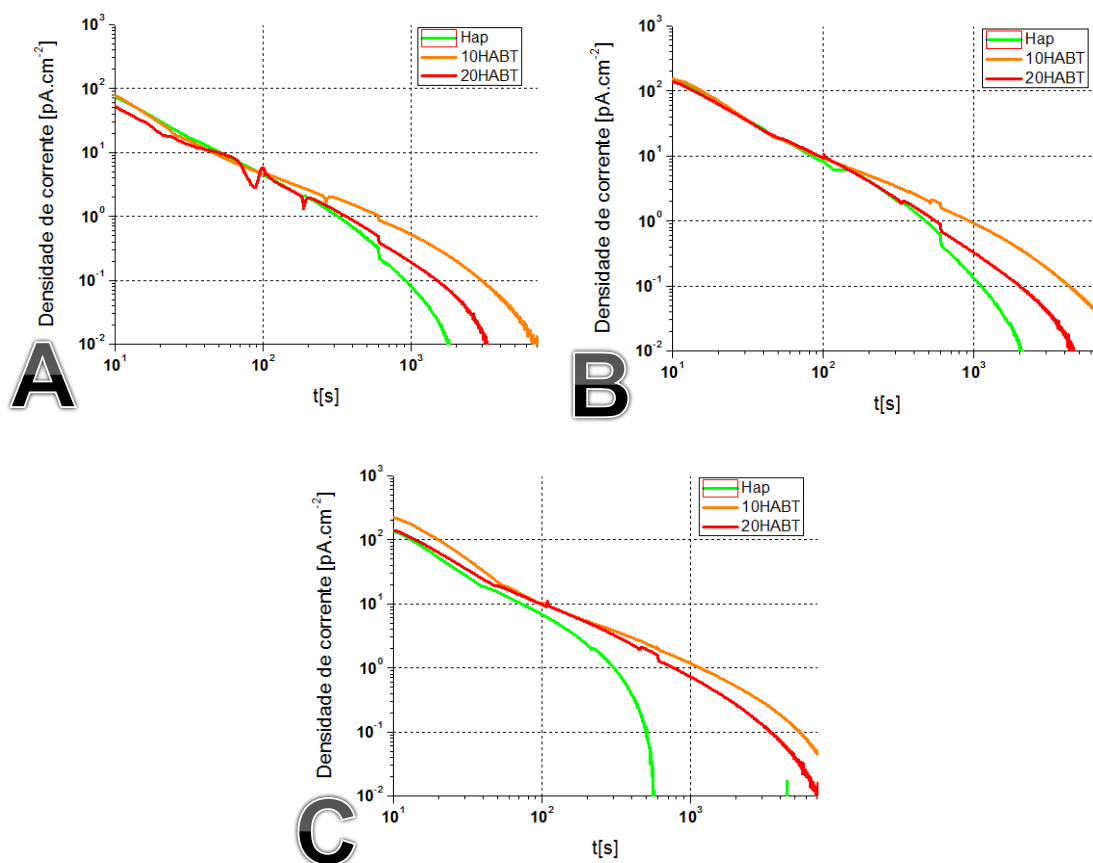


Figura V. 12- Gráficos obtidos através da medição correntes de descarga isotérmicas (IDC), medidas em atmosfera de ar, a 120°C, para as 3 amostras em estudo, após terem sido sujeitas a um campo eléctrico DC de 4KV/cm (A), 10KV/cm (B) e 20KV/cm (C) de intensidade.

Para as três diferentes intensidades de polarização, as correspondentes densidades de corrente de descarga registam uma diminuição bastante acentuada ao longo do tempo, tal como observado anteriormente em 5.3.1.

Pela análise dos gráficos da Figura V. 12, as densidades de descarga para as três condições de polarização chegam a valores próximos do limite de medida do equipamento (para as condições de medição utilizadas, são consideradas ruído) dentro do período de medição de 2h.

Pela análise dos três gráficos da Figura V. 12, é-nos sugerido que as amostras de HAp são aquelas que ficam mais rapidamente despolarizadas (valores de densidade de corrente próximo de nulas). Seguindo-se as de 20HABT e por último as de 10HABT.

5.4- TSDC

Para a realização dos testes de TSDC, a cada uma das amostras na altura de prensagem foi colocada uma folha de alumínio de 1cm de diâmetro por cima e por baixo do pó a prensar. Isto foi feito com o intuito de se conseguir uniformizar a superfície de contacto do eléctrodo do aparelho de TSDC com a amostra, tal como aconteceu com as medidas ICC/IDC.

Numa primeiro passo das medidas, cada uma das amostras para teste foi submetida a um aquecimento de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde a temperatura ambiente até uma temperatura de 523.15K (250°C), tendo-se obtido os seguintes resultados:

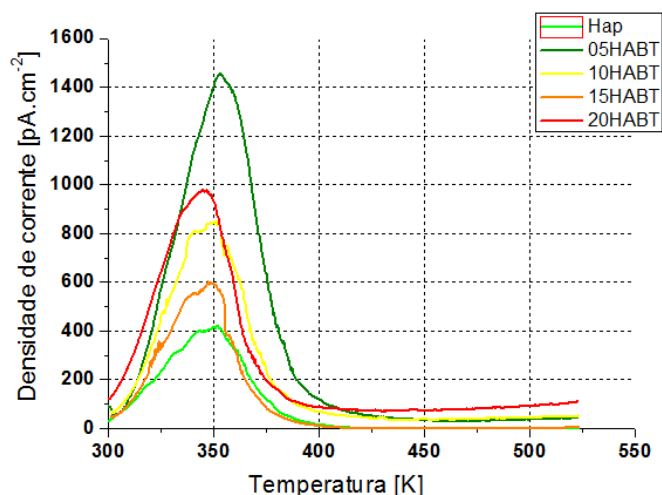


Figura V. 13- Aquecimento das amostras HAp, 5HABT, 10HABT, 15HABT, 20HABT a $2^{\circ}\text{C}/\text{m}$ da temperatura ambiente até 523.15K (250°C).

Pela análise da Figura V. 13, é visível a existência de um pico de corrente por volta dos 350K (80°C) para todas as amostras. Uma vez que a amostra não sofreu qualquer tratamento térmico prévio, nem polarização, e que o ensaio se realizou em atmosfera de ar, é sugerido que o referido pico corresponde à adsorção de água atmosférica por parte da amostra.

Num segundo momento, após o aquecimento acima descrito, cada uma das amostras foi arrefecida até à temperatura ambiente, tendo-se no dia seguinte procedido à respectiva polarização e análise de correntes termoestimuladas representadas na Figura V. 14.

Seguindo o protocolo descrito na secção 4.3.6, todas as amostras foram submetidas a um aquecimento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até aos 473.15K (200°C) onde permaneceram durante 1 hora com o

objectivo de se eliminar o efeito da incorporação de água por parte da amostra na aquisição das correntes termoestimuladas. Após este período é aplicado um campo eléctrico DC com uma intensidade de 10kV/cm durante 1 hora. Findo este período e com o campo eléctrico ainda aplicado, a amostra é arrefecida até à temperatura ambiente, altura em que o referido campo é desligado. A amostra é deixada à temperatura ambiente por um período de 2h a para eliminar a contribuição da carga espacial de rápida relaxação, período após o qual é executado um aquecimento até 523.15K (250°C) a um ritmo de 2°C/min, obtendo-se o espectro da Figura V. 14.

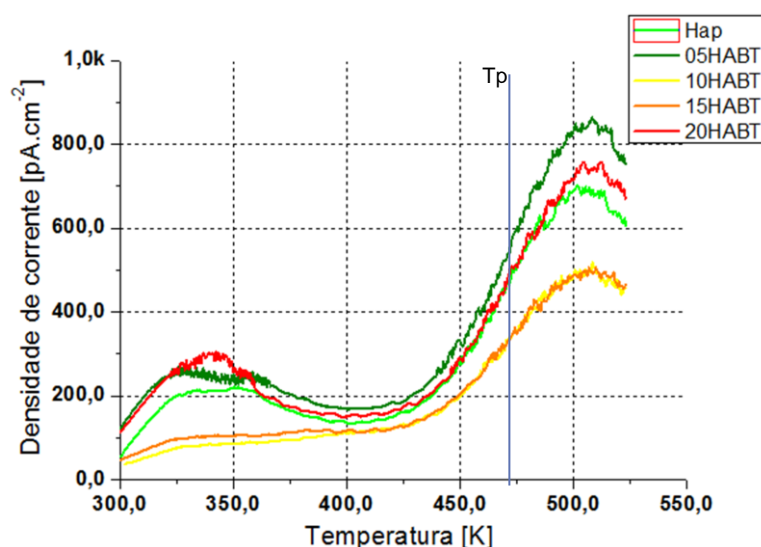


Figura V. 14- TSDC para amostras de HAp, 5HABT, 10HABT, 15HABT, 20HABT, aquecidas a 5°C/m até 473.15K, onde ficaram durante 1h, tendo sido polarizadas a esta mesma temperatura durante 1h sob a acção de um campo eléctrico de 10kV/cm, com $t_0=2h$.

Observando a Figura V. 14 é possível verificar que todas as amostras apresentam um pico de densidade de corrente aproximadamente 30°C acima da temperatura de polarização de 200°C. A este pico Neagu chamou-lhe de pico aparente [73] por estar sempre relacionado com a temperatura de polarização, e a sua temperatura mudar de acordo com as condições de polarização. Por ordem crescente do pico máximo de densidade de corrente temos: 10HABT=15HABT<HAp<20HABT<5HABT, esta última a atingir valores de 875pA/cm².

Em todas as amostras é possível verificar a existência de um pico de corrente por volta dos 340K (66.85°C), possivelmente devido a motivos de substituição carbonatada, sendo que este mesmo pico é mais intenso para as amostras de HAp, 5HABT e 20HABT. O primeiro aquecimento levou à remoção de parte da água presente nas amostras, ficando este pico mais

visível do que nos resultados anteriores (Figura V. 13) e levando à diminuição do de maior intensidade (visível anteriormente a temperatura cerca dos 350K).

De seguida, para se aferir da influência da existência de água nas densidades de correntes registadas, foram feitas novas pastilhas e submetidas a um tratamento térmico prévio, ou seja, antes de se fazer o aquecimento até aos 573.15K (250°C) a um ritmo de 2°C /m, as amostras foram colocadas durante 24 horas numa estufa a 130°C (ar ambiente) e mais 24 horas num exsicador à temperatura ambiente. Destas medidas resultou a Figura V. 15.

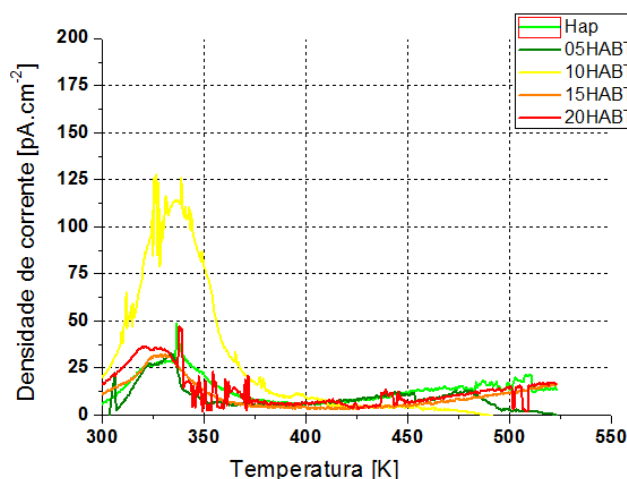


Figura V. 15- Aquecimento das amostras HAp, 5HABT, 10HABT, 15HABT, 20HABT a 2°C/m da temperatura ambiente até 523.15K (250°C), após tratamento 24h a 403.15K (130°C) + 24h no exsicador.

Comparando estes resultados da Figura V. 15 com os da Figura V. 13 verifica-se uma diminuição bastante acentuada na densidade de corrente registada, concluindo-se então que a presença de água na amostra tem forte influência no aumento da corrente registada. Porém, também nestas amostras é clara a existência de um pico de corrente por volta dos 340K (66.85°C), possivelmente justificadas pela HAp utilizada ser carbonatada, como referido anteriormente.

Tendo em atenção os resultados obtidos para a amostra 10HABT, poder-se-ia concluir que está mais carbonatada que as outras amostras, no entanto os resultados apresentados a seguir desmentem esta hipótese pelo que uma possível explicação passa pela ocorrência de algum erro de procedimento, seja na altura da preparação da amostra ou mesmo durante o registo das correntes.

De seguida, a estas mesmas amostras sujeitas a um tratamento térmico prévio, foram aplicadas as mesmas condições de polarização das amostras que originaram a Figura V. 14. Também mediante um aquecimento de $2^{\circ}\text{C}/\text{m}$, obteve-se o espectro da Figura V. 16.

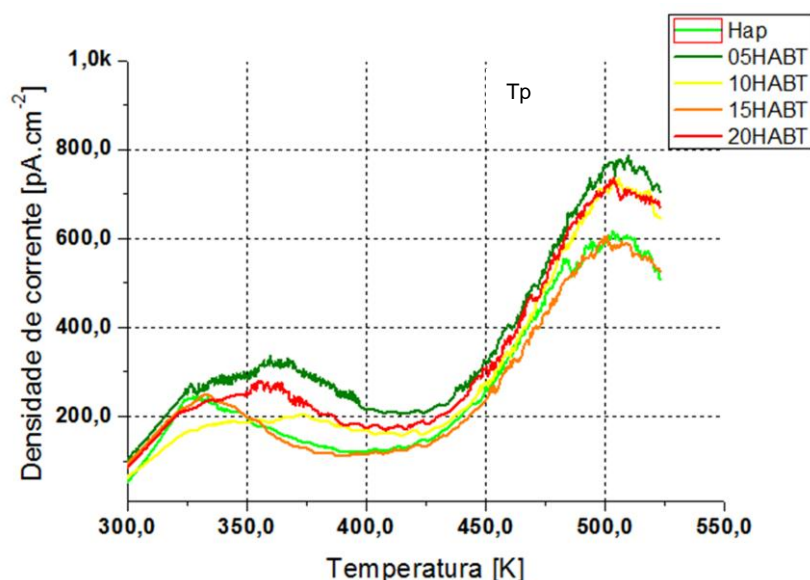


Figura V. 16- TSDC para amostras de HAp, 5HABT, 10HABT, 15HABT, 20HABT, aquecidas a $5^{\circ}\text{C}/\text{m}$ até 473.15K, onde ficaram durante 1h, tendo sido polarizadas a esta mesma temperatura durante 1h sob a acção de um campo eléctrico de 10KV/cm, com $t_0=2\text{h}$.

Observando a Figura V. 16 é possível verificar a similaridade de formas com a Figura V. 14. No entanto as diferentes composições das amostras não apresentam valores máximos de densidade de corrente na mesma ordem que na experiência realizada anteriormente. Este facto julga-se não estar relacionado com as diferenças existentes no tratamento térmico previamente feito, mas sim a diferenças inerentes às próprias amostras.

Estas diferenças podem estar relacionadas, tal como anteriormente, com o processamento das amostras, por exemplo, com o facto de quando os pós são prensados, não se poder garantir que estes tenham um mesmo grau de porosidade, nem as folhas de alumínio colocadas para melhorar o contacto com os eléctrodos da máquina de TSDC igualmente colocadas em cada prensagem.

Por ordem crescente do pico máximo de densidade de corrente temos: 15HABT<HAp<20HABT=10HABT<5HABT, esta última a atingir valores de $786\text{pA}/\text{cm}^2$.

Para todas as amostras, é possível verificar a existência de um pico de corrente por volta dos 340K (66.85°C), possivelmente devido a motivos de substituição carbonatada, tal como observado antes.

A partir dos espectros de TSDC acima representados (Figura V. 13, Figura V. 14, Figura V. 15, Figura V. 16), calculou-se a carga de polarização (Q_p) de todas as amostras, tendo-se para tal utilizado a equação:

$$Q_p = \left(\frac{1}{\beta}\right) \int_{T_{inicial}}^{T_{final}} J(T) d(T) \quad (\text{Equação V.2})$$

Onde $J(T)$ corresponde à densidade de corrente medida à temperatura T , e β a taxa de aquecimento.

Seguidamente são apresentadas duas tabelas, em que são apresentados alguns dos valores considerados mais relevantes das medições obtidas por aquecimento Tabela V. 3 e por TSDC (Tabela V. 4).

Tabela V. 3- Total de densidade de corrente medida na 1ª run de aquecimento para as amostras com e sem tratamento térmico prévio.

	1ª Run sem tratamento térmico prévio	1ª Run com tratamento térmico prévio
	Q_p [C/ cm ²]	Q_p [C/ cm ²]
HAp	6.19×10^{-7}	9.45×10^{-8}
5HABT	2.19×10^{-6}	6.24×10^{-8}
10HABT	1.36×10^{-6}	1.7×10^{-7}
15HABT	7.48×10^{-7}	7.1×10^{-8}
20HABT	1.69×10^{-6}	8.94×10^{-8}

Analisando-se a Tabela V. 3, verifica-se que as cargas de polarização das amostras sem tratamento térmico prévio são bastante superiores às das submetidas a esse mesmo tratamento. Estes resultados evidenciam a influência que a água existente nas amostras tem no aumento das densidades de corrente medidas. Entre diferentes percentagens de HAp e de BT no compósito HABT, não é possível encontrar uma tendência.

Tabela V. 4- Medições relativas à despolarização de amostras com e sem tratamento térmico prévio.

	Polarização em amostras sem tratamento térmico prévio			Polarização em amostras com tratamento térmico prévio		
	Qp [C/ cm ²]	Pico máximo de densidade de corrente registada		Qp [C/ cm ²]	Pico máximo de densidade de corrente registada	
		Temperatura [K]	J(T) [pA/ cm ²]		Temperatura [K]	J(T) [pA/ cm ²]
HAp	1.99x10 ⁻⁶	501.6	701.5	1.82x10 ⁻⁶	503.1	617.2
5HABT	2.43x10 ⁻⁶	508.1	864.5	2.45x10 ⁻⁶	509.5	786.8
10HABT	1.31x10 ⁻⁶	508.3	517.9	2.01x10 ⁻⁶	505.5	733.7
15HABT	1.38x10 ⁻⁶	506.8	505.9	1.77x10 ⁻⁶	500.8	605.8
20HABT	2.19x10 ⁻⁶	504.3	758.4	2.20x10 ⁻⁶	503.5	735.2

Analisando-se a Tabela V. 4, verifica-se que as cargas de polarização obtidas para amostras com e sem tratamento térmico prévio não se diferenciam significativamente entre si. Este resultado sugere que para efeitos de polarização, se antes do período de aplicação do campo eléctrico se submeterem as amostras a um aquecimento até 523.15K (250°C) no dia anterior e permanecerem durante 1 hora antes da aplicação do campo eléctrico DC à temperatura de polarização, é condição suficiente para as uniformizar em termos eléctricos.

Ainda da análise da Tabela V. 4, examinando com maior detalhe os valores obtidos para a carga de polarização, verifica-se que em ambos os tipos de amostras, as de 5HABT e de 20HABT são aquelas que apresentam valores mais elevados. Tal também se verifica para os valores máximos obtidos nos picos de polarização.

Para construção do espectro representado na

Figura V. 17, submeteu-se uma amostra de HAp às mesmas condições de polarização das amostras representadas nas Figura V. 14 e Figura V. 16, tendo-se obtido o respectivo espectro de TSDC após uma semana. Durante este período de uma semana, a amostra de HAp foi armazenada em estufa a uma temperatura constante de 310.15K (37°C) e em ar ambiente.

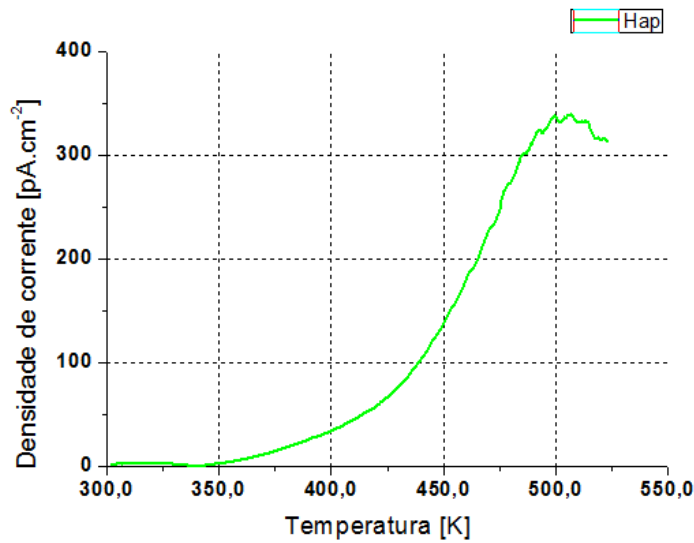


Figura V. 17- TSDC obtido para uma amostra de HAp uma semana após esta ter sido aquecida a 5°C/m até 473.15K (200°C), onde ficou durante 1h, tendo sido polarizadas a esta mesma temperatura durante 1h sob a acção de um campo eléctrico de 10KV/cm, com $t_0=2h$. Durante o período de armazenamento de uma semana, a amostra de HAp foi colocada em estufa a 310.15K (37°C).

Assumindo que o tempo de relaxação (τ), pode ser descrito pela lei de Arrhenius:

$$\tau = \tau_0 e^{-\left(\frac{E_a}{k \cdot T}\right)} \quad (\text{Equação V.3})$$

em que τ_0 é o factor pré-exponencial, E_a a energia de activação e k a constante de Boltzman.

Utilizando a equação de Arrhenius, construiu-se a Tabela V. 5 a partir dos elementos relativos ao TSDC da

Figura V. 17.

Qp [C/ cm ²]	Pico máximo de densidade de corrente registada		Ea [eV]	τ_0 [s]	τ [s]
	Temperatura [K]	J(T) [pA/ cm ²]			
7.33×10^{-7}	506.8	340	0.52 ± 0.02	$4.35 \times 10^{-3} \pm 0.5$	1.3×10^6

Tabela V. 5- Efeito das condições de polarização numa amostra de HAp uma semana após esta ter sido aquecida a 5°C/m até 473.15K (200°C), onde ficou durante 1h, tendo sido polarizadas a esta mesma temperatura durante 1h sob a acção de um campo eléctrico de 10KV/cm, com $t_0=2h$. Durante o período de armazenamento de uma semana, a amostra de HAp foi colocada em estufa a 310.15K (37°C).

Pelo tempo de relaxação, evidenciou-se que a amostra de HAp quando sujeita a estas condições de polarização, passado uma semana à temperatura biológica e em ar ambiente que contém sempre humidade, ainda permaneceria polarizada durante mais 1.3×10^6 s (15 dias). Este resultado constitui uma vantagem para aplicações médicas.

De notar que devido à maior capacidade piezoelétrica do BT, o adicionar deste material à HAp é com o intuito de aumentar ainda mais este tempo de relaxação, através de uma constante acumulação de cargas à superfície devido à aplicação de forças mecânicas.

5.5- SEM/EDS

Para caracterização morfológica dos materiais utilizados para estudo, foram efectuadas análises de imagens obtidas por microscopia electrónica de varrimento (SEM). Para uma caracterização da composição química da superfície dos materiais, foi utilizada a técnica EDS.

SEM

Primeiramente foram analisados os pós de HAp sintetizada através do método Sol-Gel descrito noutras secções, tendo-se obtido as seguintes imagens por electrões secundários:

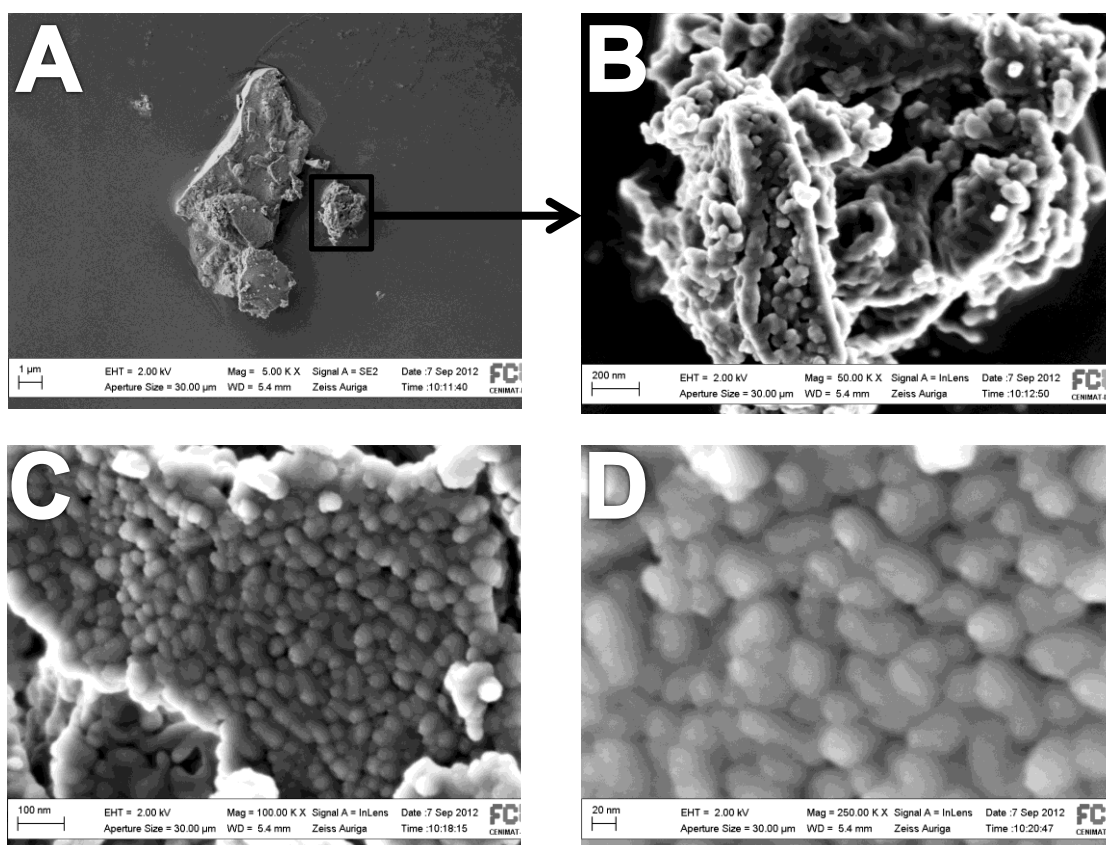


Figura V. 18- Imagens de SEM dos pós de HAp sintetizados através do método Sol-Gel, com diferentes ampliações.

Da Figura V. 18.A, aparentemente estamos na presença de uma estrutura compacta com superfície regular, no entanto, pela observação de imagens com maior poder de ampliação Figura V. 18.B,C,D, é patente que a estrutura aparentemente compacta, consiste num aglomerado micrométrico (que pode ser de maior ou de menor dimensão).

Neste caso em particular, a partícula micrométrica alvo de maior detalhe da Figura V. 18.A, possui uma dimensão aproximada de $1\mu\text{m}$ e os grãos nanométricos de HAp uma dimensão de 20-25nm Figura V. 18.D.

Depois de analisados morfológicamente os pós de HAp, foram obtidas imagens da superfície das amostras obtidas por prensagem desses mesmos pós. Recorrendo novamente à técnica SEM obtiveram-se as seguintes imagens por electrões secundários:

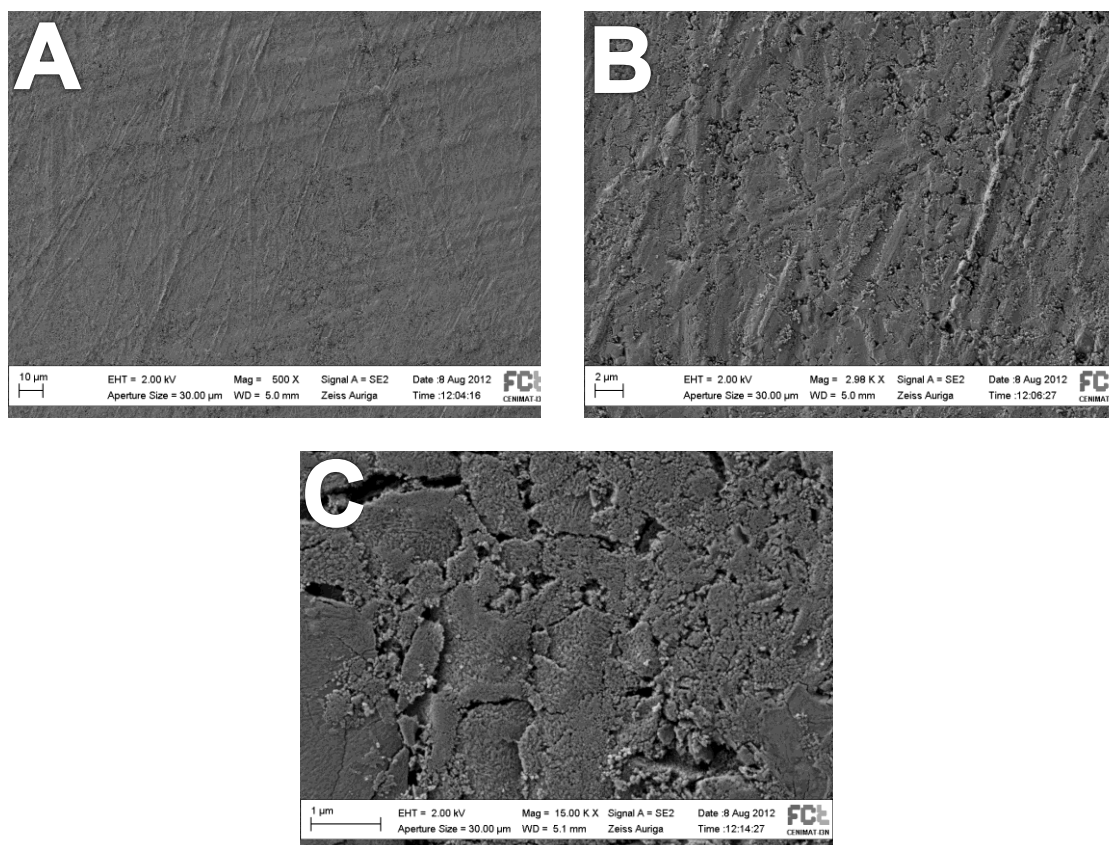


Figura V. 19- Imagens de SEM a diferentes ampliações, de uma pastilha de HAp produzida pela prensagem de pó de HAp produzido pelo método Sol-Gel.

A sequência de imagens da Figura V. 19, pretende evidenciar que uma superfície aparentemente compacta e regular Figura V. 19.A, é na realidade rugosa e com fissuras, o que para efeitos de bioactividade é algo positivo. Se por um lado aumenta a superfície de contacto com o meio, possibilitando a ocorrência de um maior número de interações, por outro permite uma mais fácil dissolução da amostra.

Numa fase seguinte, para se aferir relativamente à homogeneidade da mistura recorreu-se novamente ao SEM, mas agora a imagens obtidas também por electrões retrodifundidos.

Foram analisadas pastilhas de 20HABT em que os seus constituintes (HAp e BT) foram misturados manualmente.

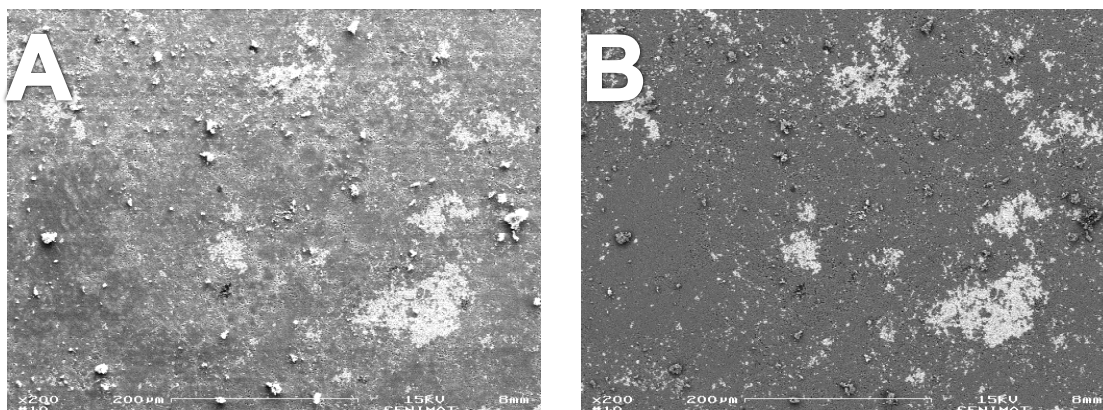


Figura V. 20- Imagens de SEM de pastilhas de 20HABT, com mistura mecânica dos pós. (A):Electrões Secundários; (B):Electrões retrodifundidos.

Pela análise das imagens da Figura V. 20, em que o material a branco corresponde ao BT (que possui elementos químicos mais pesados, responsáveis na Figura V. 20.B pelas zonas mais claras) e o cinzento à HAp, é possível verificar a formação de aglomerados de BT, sendo evidente a falta de homogeneidade da amostra, algo indesejável para efeitos aplicabilidade.

Identificado o problema de heterogeneidade na mistura dos pós, procedeu-se à mistura dos mesmos recorrendo à utilização de ultra-sons e posteriormente à sua respectiva prensagem, formando amostras. Da análise por SEM, obteve-se:

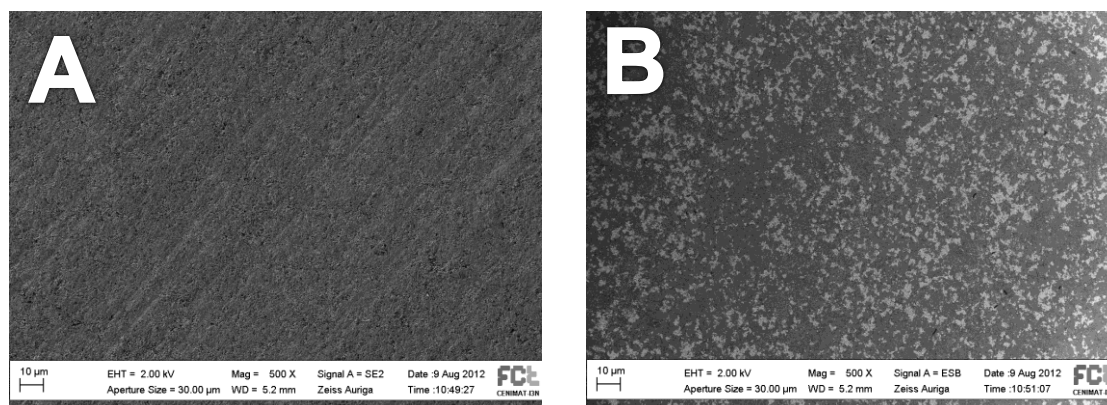


Figura V. 21- Imagens de SEM de pastilhas de 20HABT, com mistura ultra-sónica dos pós. (A): Electrões Secundários; (B): Electrões retrodifundidos

Pela análise das imagens da Figura V. 21, em que o material a branco corresponde ao BT e o cinzento à HAp, não se verifica a formação de aglomerados de BT, este encontra-se

homogeneamente distribuído em toda a amostra pelo que a mistura por ultra-sons se revelou um bom método de mistura dos pós.

EDS

Com o intuito de se determinarem as concentrações dos constituintes de uma amostra de HAp antes e após testes de bioactividade, procedeu-se a uma análise de EDS. Os espectros obtidos foram os seguintes:

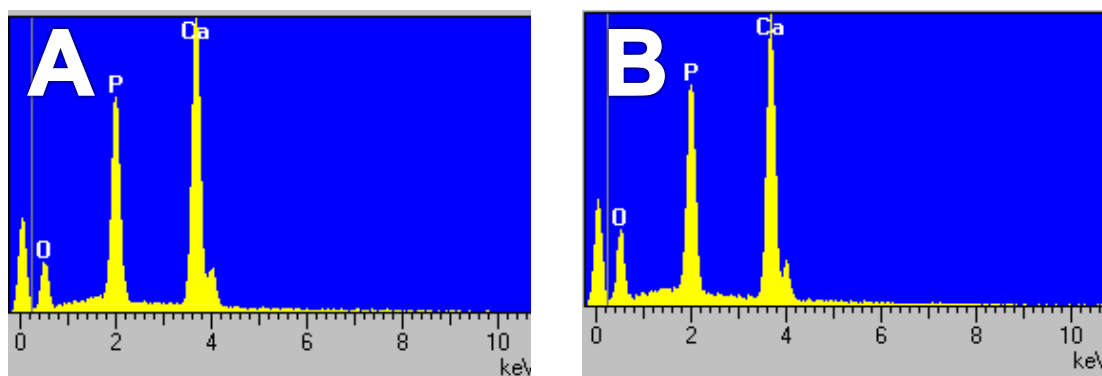


Figura V. 22- A- Espectro de EDS obtido para uma pastilha de HAp. B- face negativa de uma pastilha polarizada imersa em SBF por 12h.

Da análise dos espectros, constata-se a presença dos elementos químicos que constituem a HAp, nomeadamente cálcio, oxigénio, fósforo.

Utilizando esta técnica, é também possível determinar a razão Ca/P, a partir da razão entre as intensidades relativas dos picos de EDS, tendo-se verificado um rácio de Ca/P de 1,52 para o caso da amostra A e um rácio de 1,37 para a amostra B.

A razão de Ca/P da HAp sintetizada pelo método Sol-Gel é inferior a 1,67, pois como referido no capítulo referente à análise por FTIR (secção 5.2), ocorrem substituições de iões fosfato pelo ião carbonato.

Pelos resultados dos rácios, verifica-se que as apatites que se depositam à superfície das amostras deverão ser deficientes em cálcio.

As amostras submetidas a testes de bioactividade, foram caracterizadas morfologicamente recorrendo ao SEM. Para medição das concentrações de iões Ca e P existentes no SBF, foi utilizada a técnica de espectroscopia no U.V/Visível (secção 5.6).

SEM

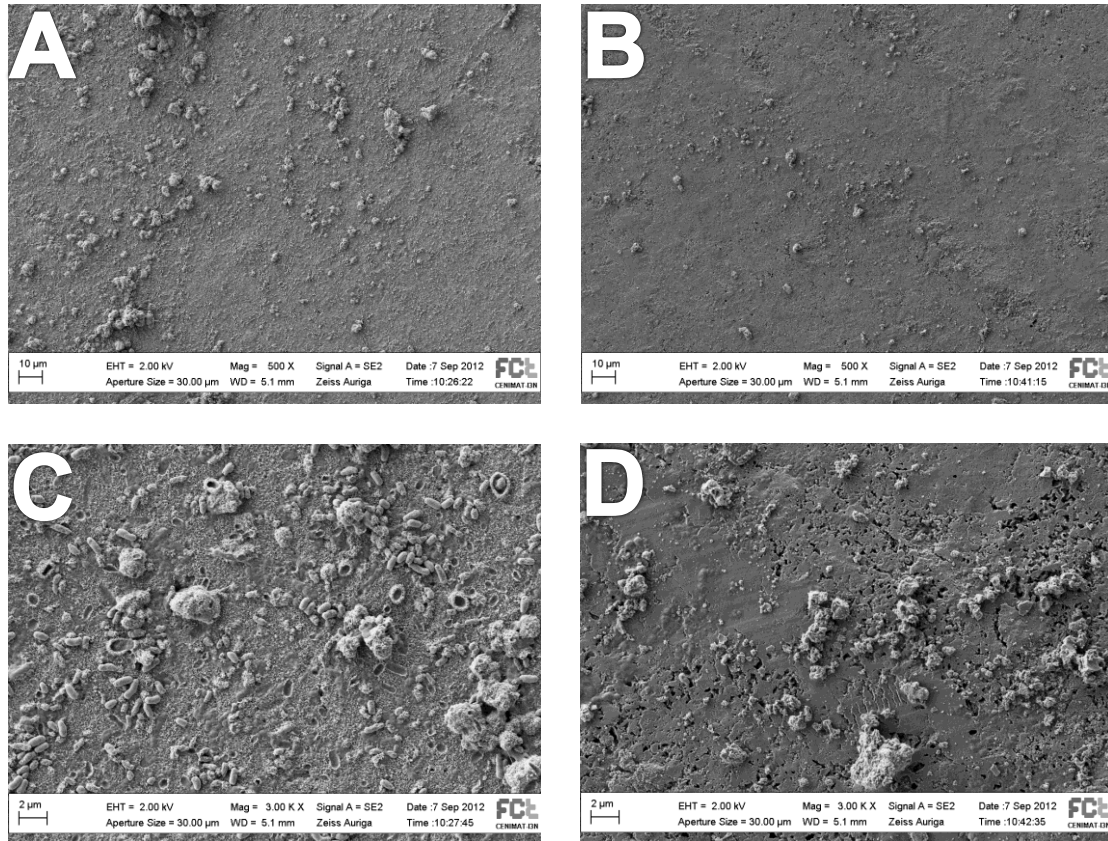


Figura V. 23- Imagens de SEM para amostras de HAp polarizadas, imersas em SBF durante 1 semana. (A,C)- Face negativa da amostra; (B,D)- Face positiva da amostra

Pela análise das imagens Figura V. 23.A,B, é possível sugerir a ocorrência de uma maior deposição de apatites na face negativa relativamente à face positiva. Tal é confirmado pelas imagens da Figura V. 23.C,D, pois na face negativa, é visível a formação de uma camada de apatites que cobre toda a superfície da amostra, enquanto que na face positiva, embora seja evidente a também deposição de apatites, não se verifica a formação de uma camada.

Tendo como objectivo, estudar a influência da adição de BT à HAp, no que diz respeito à deposição de apatites, procedeu-se a uma análise sistemática de imagens de amostras de HAp, 5HABT e de 20HABT relativamente a alguns dos tempos experimentados, a fim de se influir sobre a sua respectiva influência.

Após análise e interpretação das mesmas, se a diferença existente entre amostras polarizadas e não polarizadas é evidente, o mesmo não foi possível afirmar no que diz respeito à influência de diferentes percentagem de BT e de HAp na deposição de apatites. Com o intuito de justificar esta última afirmação, são de seguida apresentados alguns dos resultados que conduziram a esta conclusão:

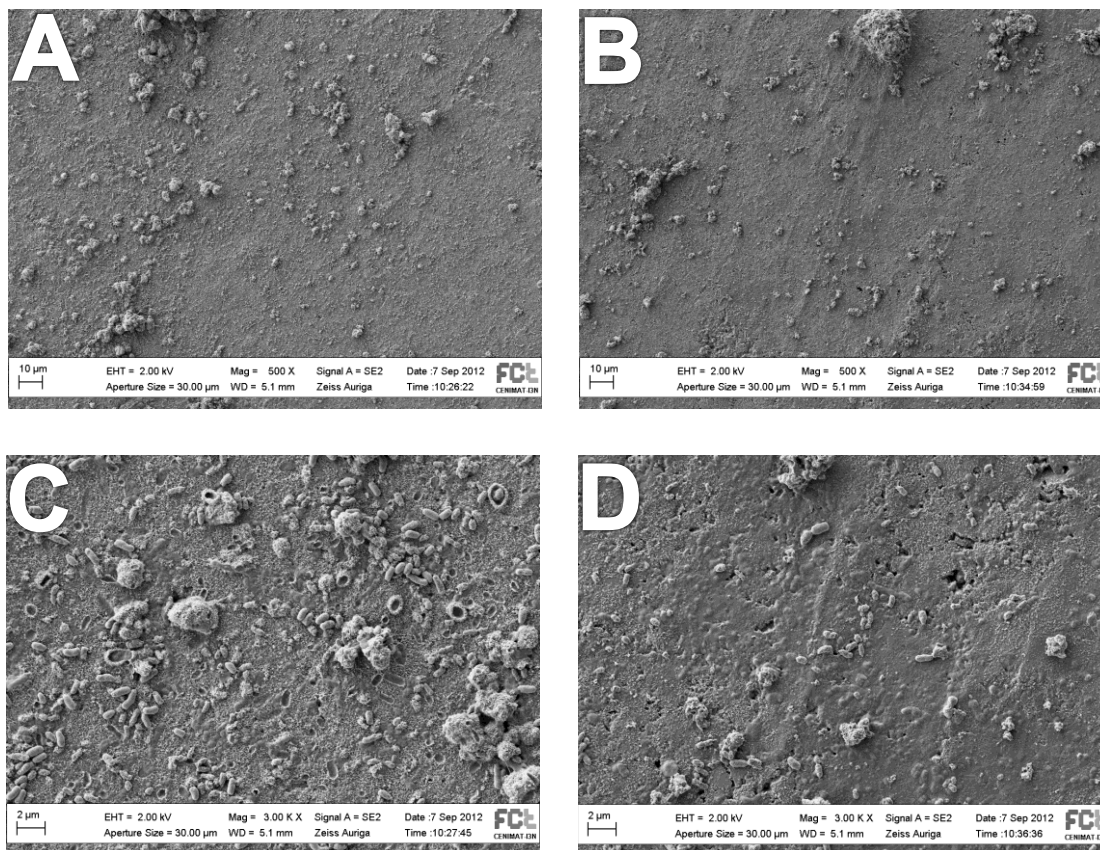


Figura V. 24- Imagens de SEM de uma mesma amostra imersa em SBF durante 1 semana. A,B- Correspondem a partes distintas duma mesma face da mesma amostra. C,D- Correspondem respectivamente à ampliação das imagens A e B.

Por observação de imagens recolhidas de pontos distintos de uma mesma face, de uma mesma amostra, é possível verificar que a deposição de apatites não decorre de uma forma uniforme, ou seja, numa mesma amostra, diferentes secções desta, apresentam diferentes graus de deposição Figura V. 24.A,B,C,D.

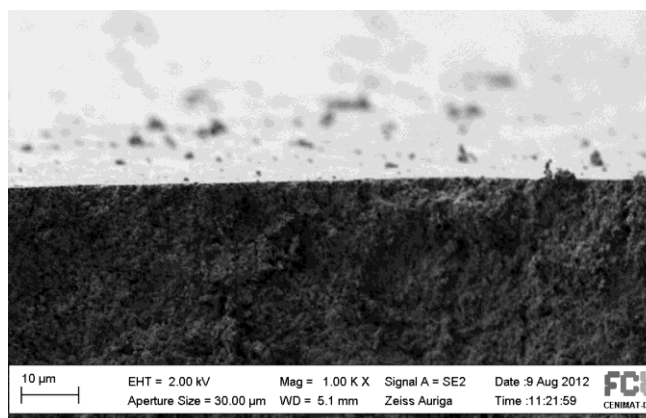


Figura V. 25- Imagem de uma secção de corte da face negativa em SEM de uma amostra de 20HABT com imersão de 3h em SBF

A inexistência de uniformização é também possível de verificar na Figura V. 25, na qual é possível observar que toda a superfície visível na imagem não possui apatites depositadas de uma forma uniforme.

Este facto inviabiliza que, mediante uma análise visual das imagens obtidas pelo SEM, se possa inferir assertivamente relativamente ao grau de precipitação entre amostras distintas.

Se para amostras, em que a precipitação de apatites é muito distinta é possível tirar relações com base em imagens de SEM, no caso particular deste estudo, no qual se pretendem avaliar as diferenças pela adição de pequenas percentagens de BT à HAp, tal não foi possível.

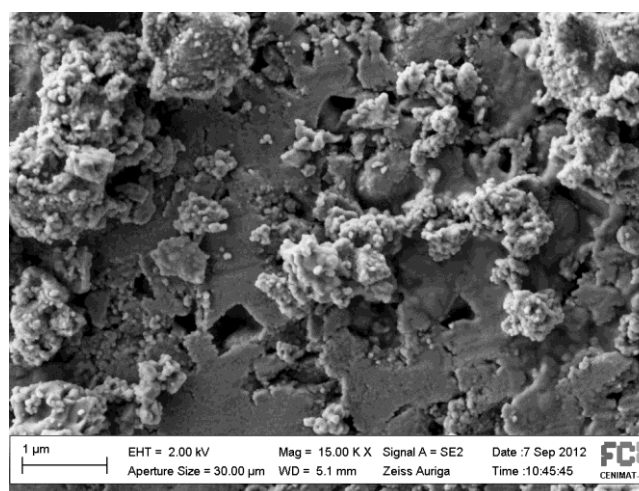


Figura V. 26- Imagem de SEM da face positiva de uma amostra de HAp imersa em SBF durante 1 semana.

Na

Figura V. 26 é possível visualizar a deposição de apatites sem camada formada. É ainda possível verificar na superfície da amostra a existência de fissuras devido ao processo de fabrico como ao de dissolução da amostra durante os ensaios de bioactividade.

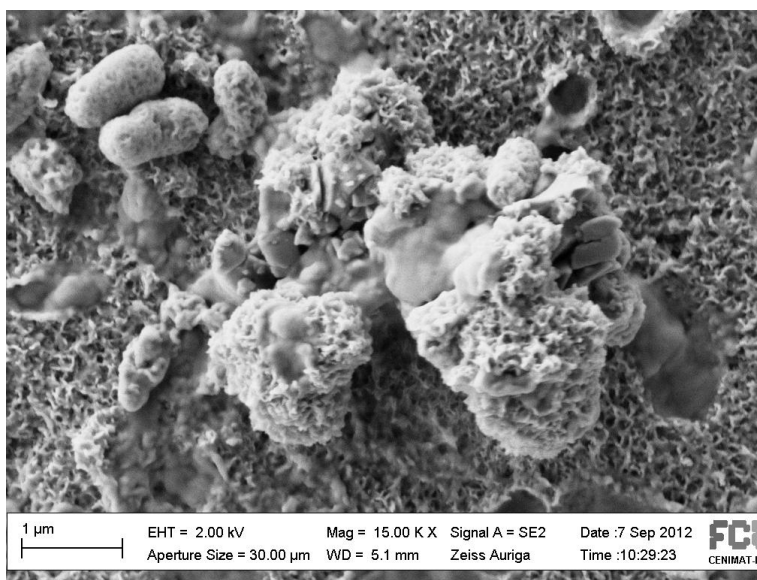


Figura V. 27- Imagem de SEM da face negativa de uma amostra de HAp imersa em SBF durante 1 semana.

Na Figura V. 27 observa-se um caso em que para além da evidente deposição de apatites, se verifica ainda a formação de uma camada. A imagem refere-se à superfície negativa de uma amostra de HAp polarizada imersa em SBF durante uma semana.

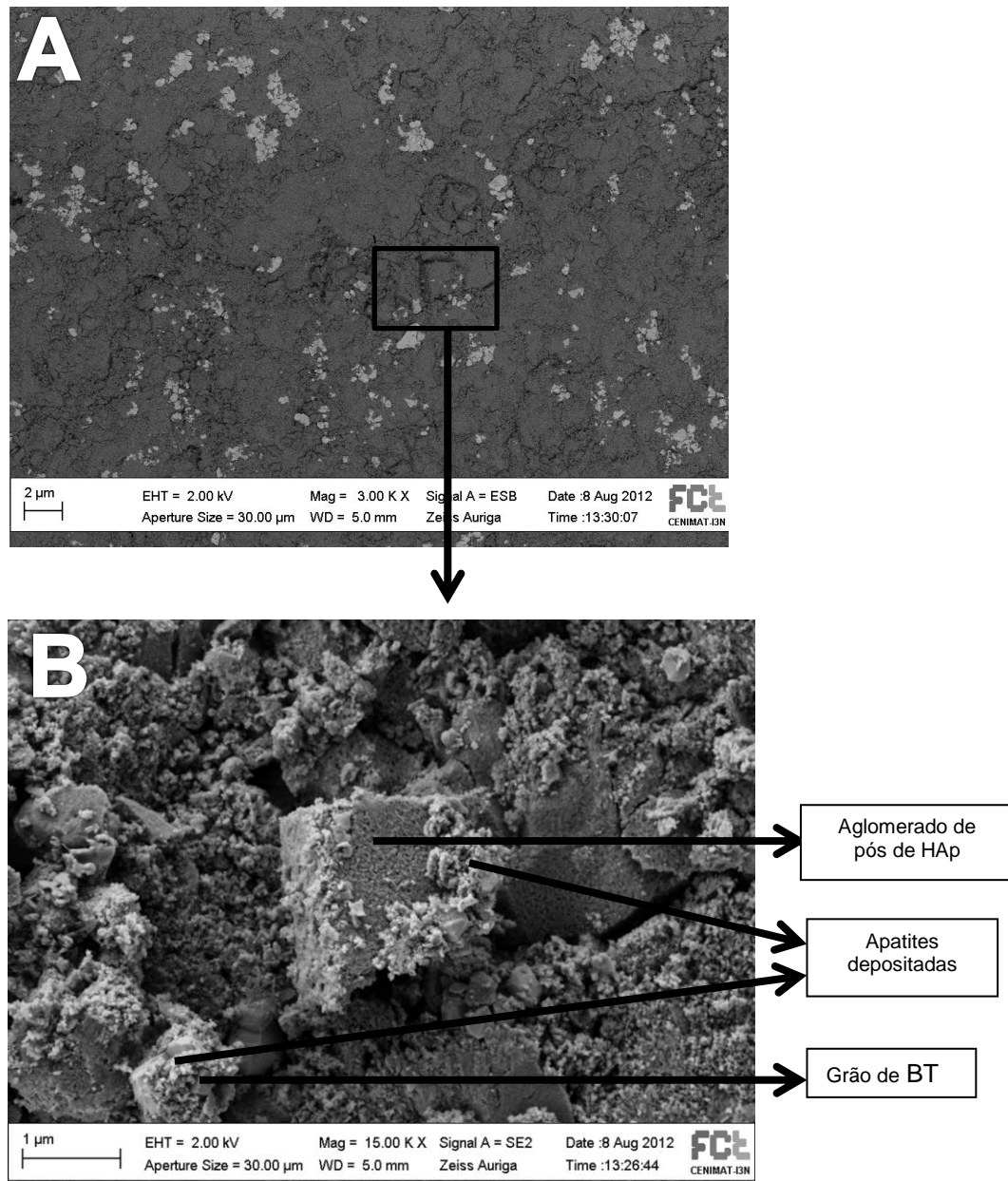


Figura V. 28- Imagem de SEM de uma amostra 10HABT, face negativa, 3h imersa em SBF. A- Electrões retrodifundidos. B- Electrões Secundários

Através Figura V. 28 pretende-se mostrar que a deposição de apatites ocorre em ambos os materiais do compósito HABT. Com deposição de apatites em aglomerados de HAp e de BT.

Como referido acima, a análise de imagens requer um certo cuidado na sua interpretação, quanto muito é possível aferir algumas conclusões sobre a bioactividade relativamente ao facto da formação ou não de uma camada de apatites que cubram toda a superfície da amostra.

5.6- Espectroscopia no U.V./Visível

Como estudo complementar da bioactividade, para além de se ter procedido à análise das imagens obtidas via SEM, foram também realizadas análises de espectroscopia no U.V./Visível às soluções de SBF após remoção das amostras. Esta análise foi feita com o intuito de se quantificar em função do tempo as variações das concentrações dos iões de cálcio e de fósforo existentes nas soluções, iões essenciais no processo de precipitação de apatites.

Mediante a análise dos resultados pretende-se melhor compreender o processo dinâmico de precipitação de cristais apatíticos na amostra. Se por um lado, devido ao processo de dissolução das amostras ocorre libertação de iões cálcio e de fósforo para o meio aumentando as suas respectivas concentrações, por outro, a precipitação dos iões já existentes no meio nas superfícies das amostras irá provocar a sua respectiva diminuição.

Os resultados obtidos das respectivas concentrações encontram-se explicitadas nas figuras abaixo.

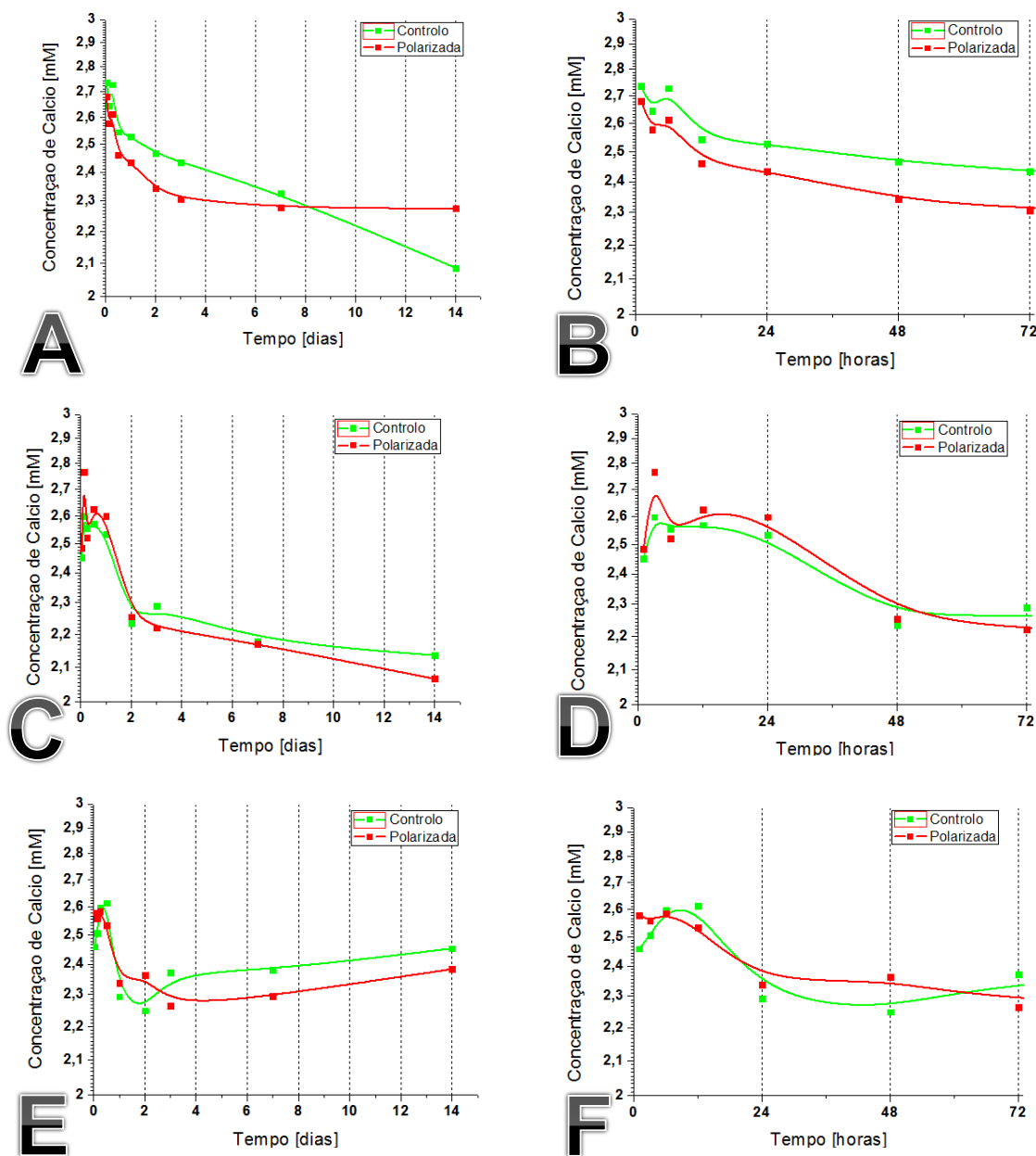


Figura V. 29- Diagramas das concentrações de Cálcio, em mM, presentes nas soluções de SBF, onde as amostras de HAp- (A,B); 5HABT- (C,D); 20HABT- (E,F), de controlo e polarizadas, estiveram imersas no decorrer dos testes de bioactividade.

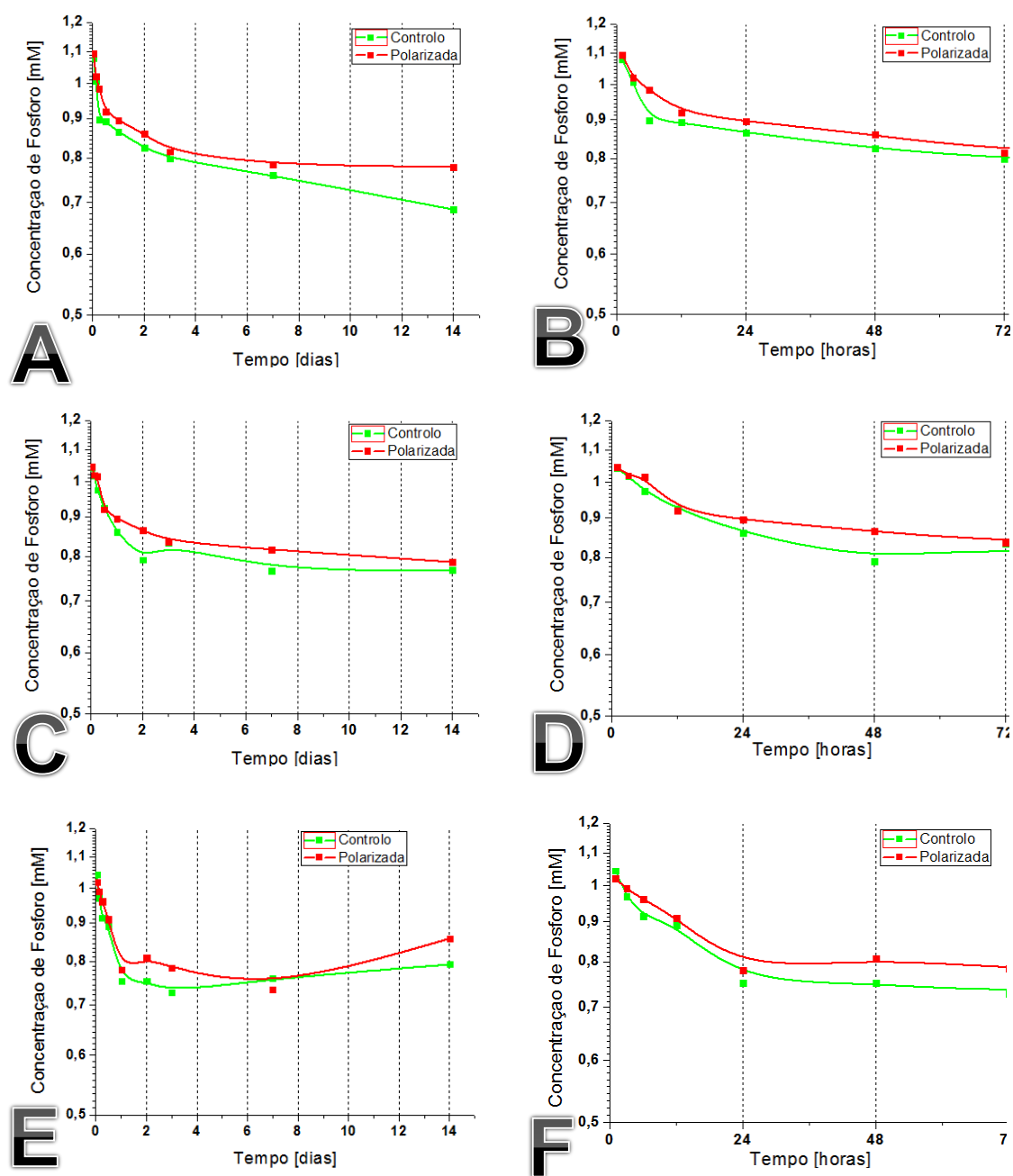


Figura V. 30- Diagramas das concentrações de Fósforo, em mM, presente nas soluções de SBF, onde as amostras de HAp (A,B), 5HABT(C,D) e 20HABT(E,F), de controlo e polarizadas, estiveram imersas no decorrer dos testes de bioactividade.

Pela análise de todas as medições efectuadas, verifica-se a ocorrência de variações significativas nas concentrações dos iões medidos pouco tempo após o início dos testes, sugerindo que todas as amostras iniciam o seu processo dinâmico de precipitação de apatites pouco tempo após a imersão em SBF.

Algo também comum a todas as medições efectuadas, passa pelo facto de numa fase inicial (variável, dependendo do tipo de amostra), se verificar uma diminuição das concentrações iónicas existentes nas soluções, o que se traduz no facto do processo de combinação dos iões existentes nas soluções para a formação e deposição de apatites nas amostras, ser dominante em relação ao processo de dissolução da amostra.

Em seguimento do exposto acima, algo também comum a todas as amostras, passa pelo facto de a partir de certo ponto temporal (variável consoante o tipo de amostra) as concentrações iónicas nas soluções serem constantes, o que significa que é atingido um equilíbrio no já referido processo de precipitação. Este equilíbrio significa que o processo de dissolução da amostra e o de deposição de apatites na sua superfície atingiu um equilíbrio (velocidades semelhantes).

Mais especificamente, analisando tanto as concentrações de Ca^{2+} e de PO_4^{3-} no SBF, parece que as amostras de HAp e de 5HABT atingem o equilíbrio sensivelmente por torno do 3º dia e a 20HABT em torno do 2º dia.

Olhando para as concentrações de cálcio dos 3 tipos de amostra testados, ao final de 2 semanas parece ter havido uma maior deposição de apatites na amostra de 5HABT devido ao facto de as concentrações de cálcio serem inferiores ao das amostras de HAp e de 20HABT. Nesta análise há que ressaltar que no final das 2 semanas, a concentração de Ca^{2+} da amostra de HAp não polarizada parece ter diminuído bastante, mas comparando-a com o verificado nas outras amostras, com a sua tendência verificada durante a 1ª semana e com resultados de outros estudos [51], tal valor é assumido como erro de procedimento (incorrecta execução protocolar previsto no kit utilizado).

Ainda analisando as concentrações de Ca^{2+} , quando é atingido o equilíbrio verifica-se que as concentrações de iões de cálcio nas soluções de SBF são menores nas amostras polarizadas do que nas não polarizadas. Isto sugere uma maior ocorrência de precipitação de apatites nas

amostras polarizadas do que nas não polarizadas, tal situação verifica-se nos 3 tipos de amostras testadas.

Mediante a análise da concentração iónica nas soluções de SBF, não é possível retirar-se informação relativamente ao tipo de fosfato que precipita na superfície das amostras, uma vez que como referido antes, devido a substituições carbonatadas da HAp utilizada, não é possível saber com a exactidão necessária a sua composição química.

5.7- DRS

A resposta em frequência de um material em termos de permitividade (ϵ) pode ser dada pela seguinte equação:

$$\epsilon^* = \epsilon_{\infty} + \sum_i^n \frac{\Delta\epsilon}{1 + j\omega\tau} + \frac{\sigma_{DC}}{j\omega\epsilon_0} \quad (\text{Equação V.4})$$

De onde:

$$\epsilon'(\omega) = \frac{\Delta\epsilon}{1 + \omega^2 * \tau^2} \quad (\text{Equação V.5})$$

$$\epsilon''(\omega) = \frac{\Delta\epsilon * \omega\tau}{1 + \omega^2 * \tau^2} \quad (\text{Equação V.6})$$

em que ϵ^* é a permitividade complexa; ϵ_{∞} é a permitividade a frequências elevadas; ϵ_0 é a permitividade no vácuo; σ_{DC} é a corresponde à condutividade eléctrica DC; ω é a frequência angular; $\Delta\epsilon = \epsilon_0 - \epsilon_{\infty}$; $\tau \rightarrow (1/\omega_r)$; $\omega \rightarrow (\omega/\omega_0)$

Equações que em termos gráficos se traduzem numa resposta gráfica semelhante à Figura V. 31.

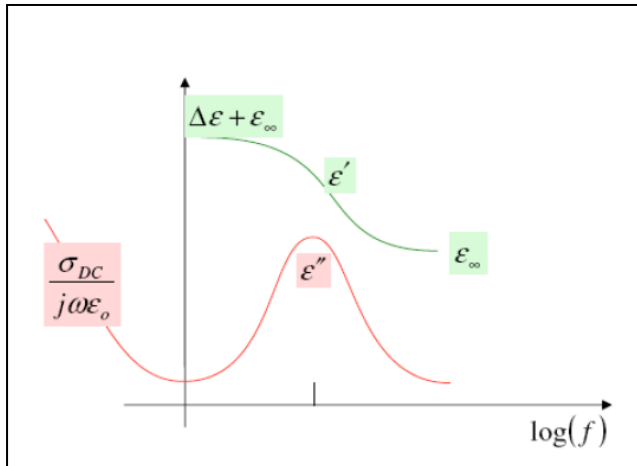


Figura V. 31 – Resposta em frequência da permitividade de um material [74].

As duas análises de DRS realizados à HAp, 10HABT e 20HABT em atmosfera de ar, encontram-se representados nas

Figura V. 32, Figura V. 33 e Figura V. 34 respectivamente. De suas análises constata-se que:

- Da primeira run, comum a todas as amostras é a existência de um pico de grande intensidade por volta dos 300K, pico esse que corresponde a um composto volátil presente na amostra, uma vez que desaparece na run realizada em seguida. Tal pico é associado à presença de água livre incorporada pelas amostras aquando do seu processo de produção e de armazenamento, uma vez que o pico aumenta de intensidade para menores frequências de aquisição sem no entanto variar a temperatura no seu máximo.
- Nos gráficos relativos à amostra 20HABT, o pico associado à água livre é mais definido e estreito do que na HAp e no 10HABT e está deslocado para temperaturas um pouco mais elevadas, podendo ser uma indicação de que os iões da água são mais atraídos pelos dipolos presentes no BT.
- Nas segundas runs, nos gráficos da componente imaginária da permissividade (ϵ''), observa-se a existência de um pico que se desloca em frequência com o aumento da temperatura, podendo ser associado a algum mecanismo de polarização intrínseco da HAp, uma vez que é comum a todas as amostras (contendo ou não BT).
- Ainda nas segundas runs, algo comum a todos os gráficos da permissividade componente real (ϵ') e imaginária (ϵ''), é a existência de um aumento bastante significativo dos seus valores para temperaturas mais elevadas e frequências mais baixas, esse comportamento é associado a fenómenos de polarização dos eléctrodos. De notar que para as amostras com BT, os valores observados são inferiores aos da HAp.

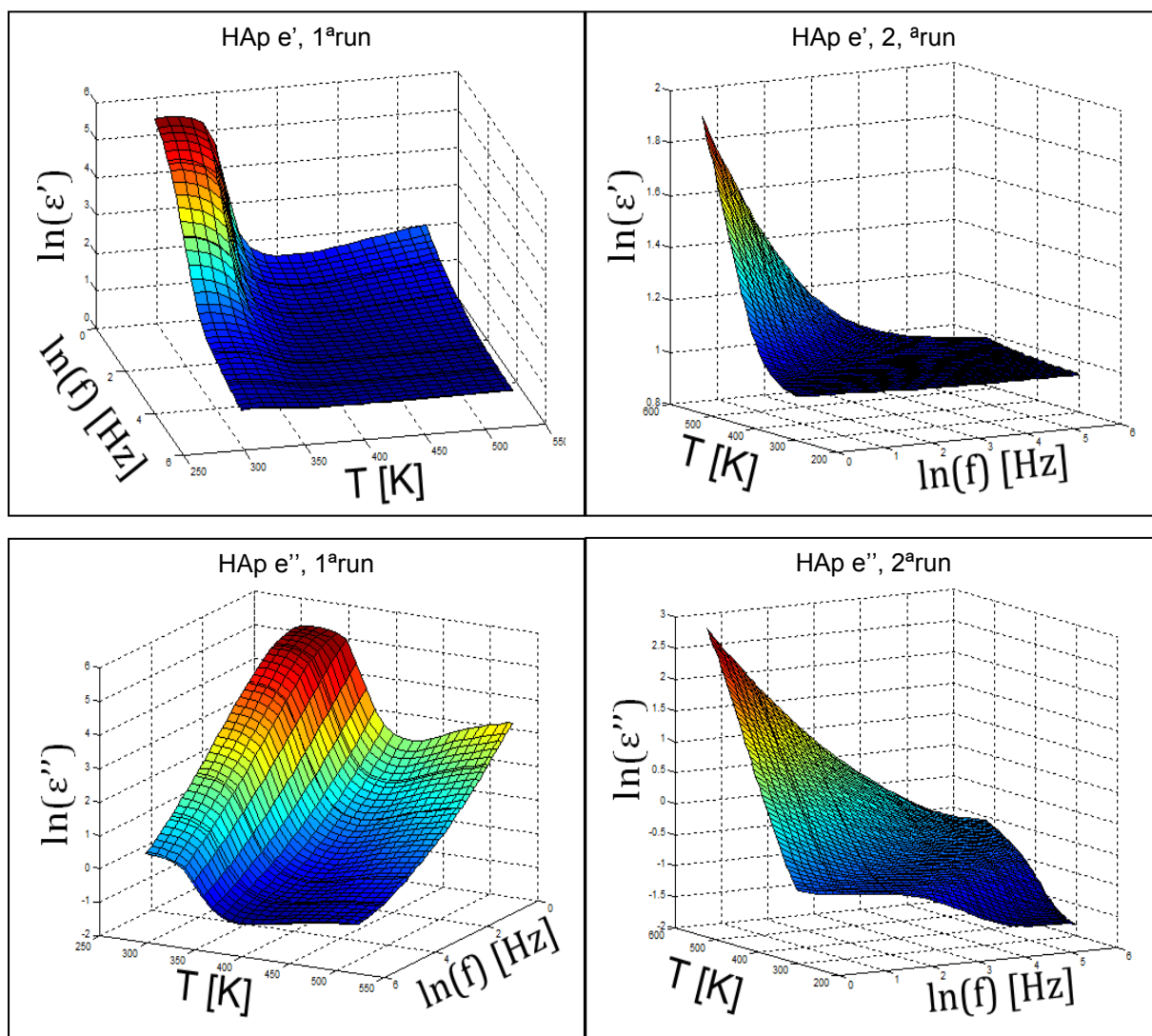


Figura V. 32- Espectros de DRS da primeira e da segunda run relativos à componente real (ϵ') e à componente imaginária (ϵ'') da permitividade em função da frequência (f) e da temperatura (T), obtidos em atmosfera de ar para uma amostra de HAp.

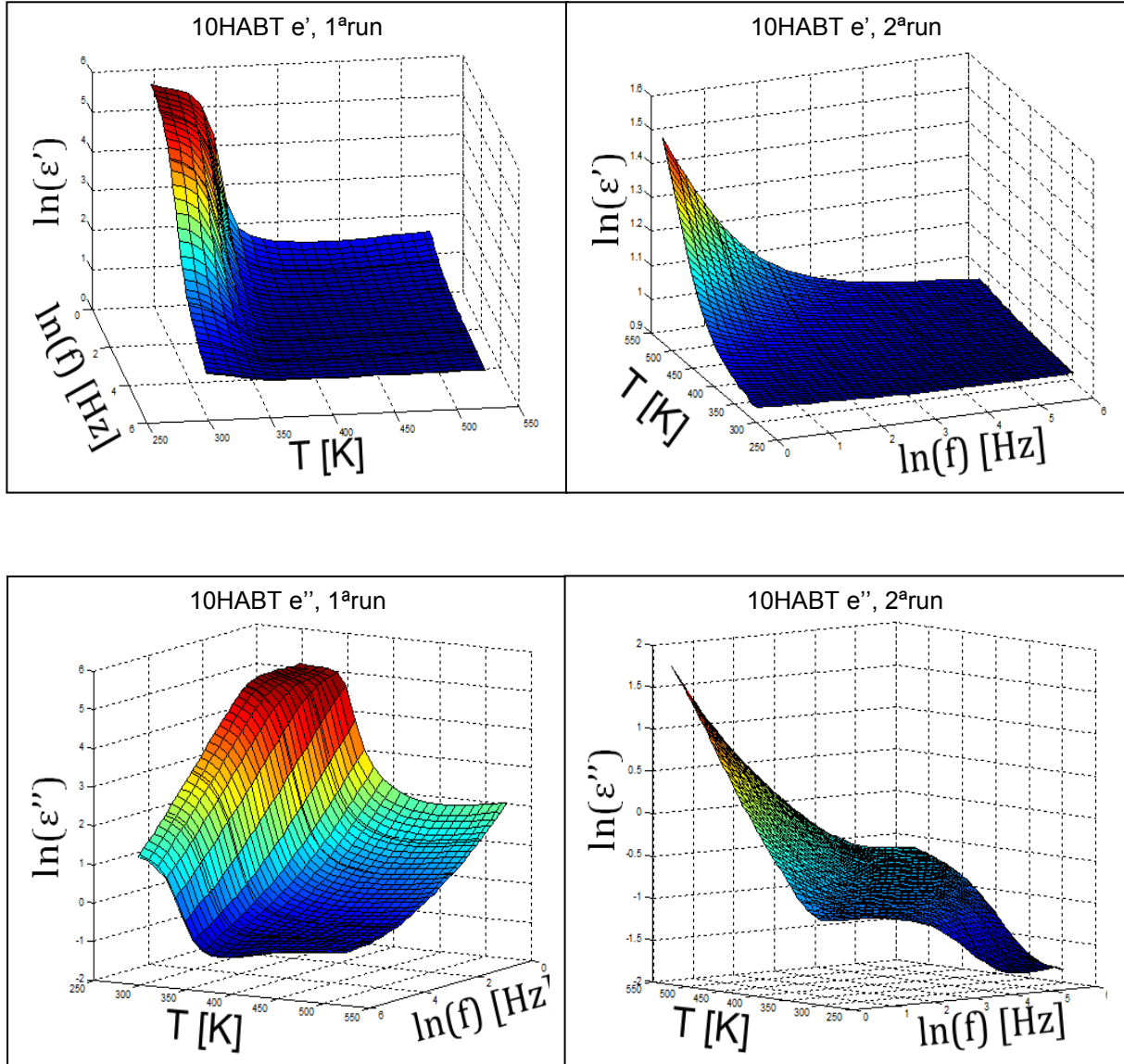


Figura V. 33- Espectros de DRS da primeira e da segunda run relativos à componente real (ϵ') e à componente imaginária (ϵ'') da permissividade em função da frequência (f) e da temperatura (T), obtidos em atmosfera de ar para uma amostra de 10HABT.

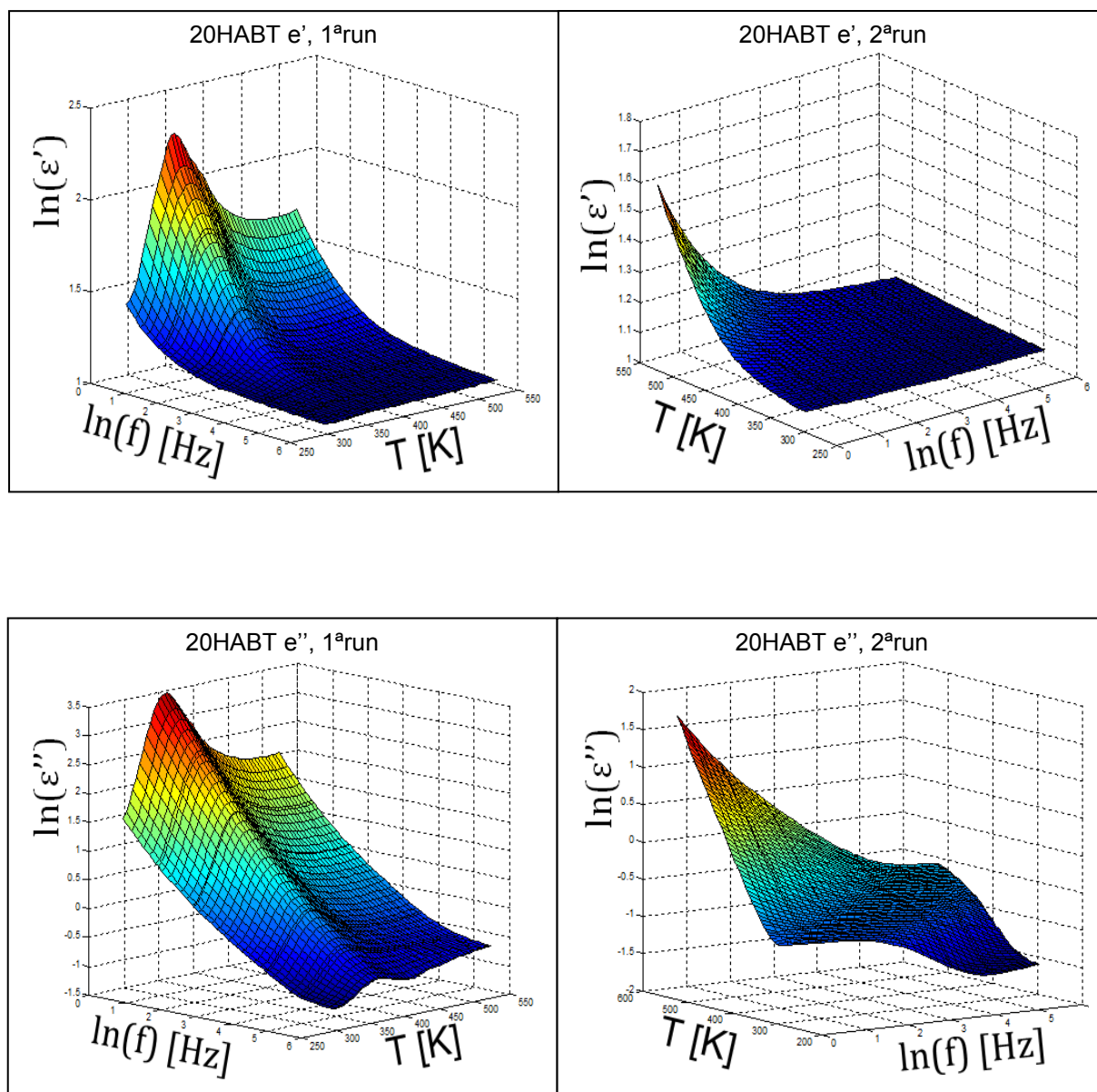


Figura V. 34- Espectros de DRS da primeira e da segunda run relativos à componente real (ϵ') e à componente imaginária (ϵ'') da permissividade em função da frequência (f) e da temperatura (T), obtidos em atmosfera de ar para uma amostra de 20HABT.



VI-Conclusões e perspectivas futuras

Conclusões:

O objectivo central do presente projecto de investigação foi estudar a influência na bioactividade de implantes ósseos da adição de BT a HAp, tendo-se para o efeito recorrido a diversas técnicas de estudo.

O projecto foi iniciado pela produção de pós de HAp pelo método Sol-Gel. Pela observação destes pós em imagens SEM, observou-se que o seu diâmetro médio varia entre os 20nm e os 25nm, tendo-se por EDS identificado a presença dos seus constituintes básicos, nomeadamente oxigénio, cálcio e fósforo, tendo-se pela mesma técnica calculado um rácio de Ca/P de 1.52. Esperava-se um rácio de 1.67 para a hidroxiapatite mas o valor mais baixo obtido e, de acordo com outras medidas (FTIR), deve-se ao facto de haver um número de substituintes CO_3^{2-} , i.e., a hidroxiapatite se encontrar carbonatada. De voltar a referir, que o mesmo acontece com a HAp do osso. Da análise de DRX da HAp a diferentes temperaturas, observou-se a sua cristalinidade e não existência de contaminação (CaO e β -TCP), bem como a independência do tamanho do cristalito para as temperaturas analisadas.

Da análise DRX dos pós de BT, é possível verificar que se trata de um material cristalino, cuja dimensão do cristalito apresenta uma diferença considerada significativa entre os 30°C e os 220°C analisados. Esta diferença de dimensão está relacionada com a mudança de estrutura aos 120°C, nomeadamente de tetragonal para cúbica.

Da análise DRX de pós de 20HABT, é possível identificar picos característicos tanto de HAp como de BT, não se verificando portanto uma alteração estrutural dos materiais constituintes, inferindo-se a não existência de reacções químicas entre ambos.

Pela análise FTIR, concluiu-se que a HAp produzida é carbonatada tipo AB, estando este facto relacionado com o rácio do Ca/P calculado através de EDS ser de 1.52 e não de 1.67 como referido atrás. Quanto ao FTIR do BT apresenta os picos esperados, em concordância com os resultados de DRX.

Mediante os estudos de correntes isotérmicas efectuados, verifica-se que aumentando a intensidade do campo eléctrico DC aplicado às amostras, se obtêm densidades de corrente de carga (ICC) de maior intensidade. Este aumento de ICC é proporcionalmente muito superior ao aumento da intensidade do campo eléctrico DC aplicado. Da análise dos mesmos resultados, constata-se também que com o aumento de temperatura, as correntes ICC registadas são tendencialmente mais reduzidas, podendo este acontecimento estar relacionado com o facto de a 120°C a água presente nas amostras ter evaporado como com a mudança de estrutura por

parte do BT, que ocorre precisamente a esta temperatura. Da análise do comportamento das correntes isotérmicas de descarga (IDC), tanto a 80°C como a 120°C, a amostra de 10HABT parecer ser aquela que permanece mais tempo com carga.

Recorrendo à técnica TSDC, foi possível observar a influência que a presença de água nas amostras tem no aumento das densidades de corrente registadas, com correspondente pico de intensidade por volta dos 350K (80°C) para todas as amostras analisadas. Verificou-se que amostras sujeitas a um tratamento térmico prévio (com o objectivo de minimizar o pico correspondente à água incorporada nas amostras), apresentam um pico de densidade de corrente aos 340K (66.85°C), indiciando que a HAp utilizada é carbonatada tipo AB, em concordância com as análises FTIR e resultados publicados na Figura V. 7.

Ainda mediante a técnica de TSDC, a polarização das amostras seguindo o protocolo explicitado na secção 4.3.6 e 5.4, permitiu observar a existência de um pico de polarização aproximadamente aos 303.15K (30°C) acima da temperatura de polarização. Pela análise da Tabela V. 4, verifica-se que o tratamento térmico prévio a efectuar nas amostras não influencia significativamente as correntes de polarização obtidas, pelo que é suficiente seguir o protocolo de polarização utilizado (deixando de ser necessário um tratamento térmico prévio). Da mesma tabela, se infere que as amostras 5HABT e 20HABT são as que apresentam valores de carga de polarização mais elevados, assim como respectivos picos de polarização, razão pela qual foram seleccionadas juntamente com a HAp (para efeitos comparativos) para execução de ensaios de bioactividade.

Numa última análise por TSDC, verificou-se através do cálculo do tempo de relaxação que, uma amostra de HAp polarizada nas condições descritas em 4.3.6 e 5.4, após armazenamento de uma semana à temperatura de 37°C em ar ambiente, se obteve um tempo de relaxação de cerca de 15 dias, pelo que se pode afirmar que a mencionada amostra, nas mesmas condições de armazenamento, permaneceria polarizada durante mais 15 dias.

Numa fase inicial, por SEM verificou-se que para a mistura HABT ser homogénea deve-se proceder à mistura dos seus constituintes por ultra-sons.

Numa fase posterior, recorrendo a imagens de SEM, procedeu-se à análise das amostras sujeitas a testes de bioactividade, a partir das quais se observou uma maior precipitação de apatites na face negativa do que na face positiva, estando a precipitação de apatites nesta última, a níveis semelhantes aos das amostras não polarizadas. Perfazendo uma análise para avaliar a diferença na deposição de apatites entre as diferentes amostras (HAp, 5HABT e 20HABT), procedeu-se a uma análise sistemática das imagens obtidas, concluindo-se que devido ao carácter heterogéneo da deposição de apatites, não é evidente que a presença de titanato faça

aumentar a quantidade de apatites depositadas. Por análise das mesmas imagens, conclui-se que as amostras sofrem processos de dissolução e que a precipitação de apatites ocorre na HAp e no BT. Recorrendo à técnica de EDS, verificou-se que as apatites que depositam à superfície das amostras são deficientes em cálcio.

Por análise de espectroscopia no U.V./Visível do SBF onde foram realizados os ensaios de bioactividade, verifica-se que o processo dinâmico de precipitação de apatites se inicia imediatamente após a imersão das amostras em SBF, sendo que na fase inicial o processo de combinação dos iões no SBF é dominante em relação ao processo de dissolução da amostra, até que após algum tempo estes processos atingem o equilíbrio (evidenciado pela manutenção das concentrações dos iões em SBF). De uma análise mais atenta dos resultados, pode-se ainda aferir que algo comum a todas as amostras é o facto de as concentrações de cálcio nas soluções de SBF serem menores nas amostras polarizadas do que nas não polarizadas, sugerindo uma maior ocorrência de precipitação de apatites nas amostras polarizadas do que nas não polarizadas. Ainda da análise das concentrações de cálcio, infere-se uma maior deposição de apatites na amostra 5HABT.

Dos ensaios de DRS realizados, algo comum a todas as amostras analisadas é a nítida influência da água na componente de permissividade, sugerindo-se uma possível maior atracção dos iões da água por parte dos dipolos existentes no BT em comparação com a HAp. Verifica-se ainda por análise dos segundos ensaios, a existência de um mecanismo de polarização intrínseco à HAp, que só é revelado após a remoção de água resultante do tratamento térmico correspondente ao primeiro ensaio.

Perspectivas Futuras:

O trabalho de investigação por definição é um processo de constante aprendizagem e de contínuas descobertas e desenvolvimento, pelo que tendo em vista o continuar deste mesmo processo, sugiro de seguida algumas melhorias/ sugestões que creio poderem contribuir de forma positiva para desenvolvimentos futuros:

- Utilizar o método sol-gel para produzir fosfatos de cálcio com uma razão Ca/P diferentes da encontrada na HAp;
- Considerando a aplicabilidade médica da HAp e do HABT, proceder a estudos de polarização em amostras com porosidade e interconexão suficiente, que permita a penetração no mesmo por parte do material biológico;

- Sinterizar as amostras, de forma a se enrijecer as mesmas, de modo a se minimizar o seu processo de dissolução, permitindo que melhor se contabilize o processo de associação dos iões existentes em SBF para formação de apatites;
- Determinar o coeficiente piezoelétrico da mistura HABT;
- Proceder a uma análise estatística das imagens de SEM, com o intuito de melhor inferir sobre a quantidade de apatites precipitadas à superfície;
- As amostras submetidas a ensaios de bioactividade em SBF devem ser colocadas de forma a que ambas as superfícies fiquem igualmente expostas ao SBF (colocadas verticalmente);
- Realizar testes de bioactividade em SBF, enquanto simultaneamente se sujeita as referidas amostras a pressão mecânica.



Bibliografia

- [1]- Medtech Insight- Tissue Engineering and Cell Transplantation: Technologies, Opportunities, and Evolving Markets, July 2004. [Em linha] [Consult. 5 Abril 2012]. Disponível em <http://www.medtechinsight.com/ReportA401.html>.
- [2]- Judas, Fernando; Dias, Rui; Figueiredo, Helena- Implantes em cirurgia ortopédica. (2008)
- [3]- Bohner, M.- Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. *Materials Today*, (2010), 13: 24-30.
- [4]- Stevens, M.- Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*, (2008), 5: 18-25.
- [5]- Ducheyne, P.; Qiu, Q.- Bioactive ceramics: The effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* (1999), 20: 2287-2303.
- [6]- Heness, G.; Ben-Nissan, B.- Innovative bioceramics. *Materials Forum* (2004), 27, 104-114.
- [7]- Heimann, R.B.- Materials science of crystalline bioceramics: A review of basic properties and applications. *CMU J.* (2002), 1: 23-46.
- [8]- Prudhommeaux, F.; Schiltz, C.; Lioté, F.; Hina, A.; Champy, R.; Bucki, B.; Ortiz-Bravo, E.; Meunier, A.; Rey, C.; Bardin, T.- Variation in the inflammatory properties of basic calcium phosphate crystals according to crystal type. *Arthritis Rheum.* (1996), 39: 1319-1326.
- [9]- Uchida, A.; Araki, N.; Shinto, Y.; Yoshikawa, H.; Kurisaki, E.; Ono, K.- The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery. *The Journal of Bone & Joint Surgery B* (1990), 72: 298-302.
- [10]- Davies, J. E.- The importance and measurement of surface charge species in cell behaviour at the biomaterial interface. In: *Surface Characterisation of Biomaterials*, edited by R. D. Ratner. Amsterdam: Elsevier, (1988).
- [11]- F.R. Baxter; C.R. Bowens; I.G. Tuner; A.C.E. Dent.- Electrically Active Bioceramics: A review of Interfacial Responses. *Annals Of Biomedical Engineering* (2010) 38,6: 2079-2092.
- [12]- Universidade Estadual do oeste do Paraná- Campus de Foz do Iguaçu- Centro de Engenharias e Ciências Exactas- Laboratório de Materiais- Apostila de Materiais Elétricos (2010).
- [13]- Fukada, E.; and I. Yasuda. On the piezoelectric effect of bone. *Journal of the Physical Society of Japan* (1957) 12(10): 1158-1162.
- [14]- Hastings, G. W.; F. A. Mahmud.- The electromechanical properties of fluid filled bone: a new dimension. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (1991) 2(2): 118-124.

- [15]- Best, S.; A. Porter; E. Thian; and J. Huang.- Bioceramics: past, present and for the future. *J. Eur. Ceram. Soc.* (2008) 28(7): 1319-1327.
- [16]- Hench, L. L.- Bioceramics. *J. Am. Ceram. Soc.* (1998) 81:1 705-1728.
- [17]- Yamashita, K.; K. Kitagaki; T. Umegaki.- Thermal instability and proton conductivity of ceramic hydroxyapatite at high temperatures. *J. Am. Ceram. Soc.* (1995) 78(5): 1191-1197.
- [18]- Martins, João. (2011). Membranas Compósitas de Policaprolactona/Hidroxiapatite para Aplicação Estomatológica - Tese de Mestrado em Materiais. Lisboa: FCT/UNL.
- [19]- Barium titanate: ferroelectric properties. [Art]. *Encyclopædia Britannica Online*. Retrieved 11 August 2012, from <http://www.britannica.com/EBchecked/media/2939/Ferroelectric-properties-of-barium-titanate-Above-120-C-the-structure>.
- [20]- Kobayashi, T.; S. Nakamura; K. Yamashita.- Enhanced osteobonding by negative surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* (2001) 57(4):477-484.
- [21]- Yamashita, K.; N. Oikawa; T. Umegaki.- Acceleration and deceleration of bone like crystal growth on ceramic hydroxyapatite by electric poling. *Chem. Mater.* (1996) 8(12): 2697-2700.
- [22]- Itoh, S.; S. Nakamura; M. Nakamura; K. Shinomiya; K. Yamashita.- Enhanced bone ingrowth into hydroxyapatite with interconnected pores by Electrical Polarization. *Biomaterials* (2006) 27(32):5572-5579.
- [23]- Nakamura, S., H. Takeda, and K. Yamashita. Proton transport polarization and depolarization of hydroxyapatite ceramics. *J. Appl. Phys.* 89(10):5386-5392, 2001.
- [24]- Smith, W. F.- Princípio de ciência e engenharia dos materiais. 3 ed. Portugal: McGraw-Hill, 1998.
- [25]- Liu, Dan; Jinag, Yu Li.- The enhanced and optimal piezoelectric coefficients in single crystalline barium titanate with engineered domain configurations. *Applied physics letters* (2003) 83,6.
- [26]- Uchino, K.; Sadanaga, E.; Hirose. T.- Dependence of the Crystal Structure on Particle Size in Barium Titanate. *J. Am. Ceram. Soc.* (1989) 72(8): 1555-1558.
- [27]- Ohgaki, M.; Kizuki, T.; Katsura, M.; Yamashita, K.- Manipulation of selective cell adhesion and growth by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* (2001) 57(3):366-373.
- [28]- Jeong, J. H.; I. J. Kwak; H. I. Kim; J. L. Ong; H. R. Rawls; Y. J. Park. The 81st General Session of the International Association for Dental Research. Goteberg, Sweden, 2003.

- [29]- Dekhtyar, Y.; N. Polyaka; R. Sammons.- Electrically charged hydroxyapatite enhances immobilization and proliferation of osteoblasts. 14th Nordic Baltic Conference on Biomedical Engineering and Medical Physics, Vol. 20. Berlin, Heidelberg: Springer, 2008.
- [30]- Kizuki, T.; Ohgaki, M.; Katsura, M.; Nakamura, S.; Hashimoto, K.; Toda, Y.; Udagawa, S.; Yamashita, K.- Effect of bone like layer growth from culture medium on adherence of osteoblast like cells. *Biomaterials* (2003) 24(6):941-947.
- [31]- Nakamura, M.; Nagai, A.; Tanaka, Y.; Sekijima, Y.; Yamashita, K.- Polarized hydroxyapatite promotes spread and motility of osteoblastic cells. *J. Biomed. Mater. Res. A.* (2009) 92(2):783:790.
- [32]- Hwang, K.S.; Song, J.E.; Jo, J.W.; Yang, H.S.; Park, Y.J.; Ong, J.L.; Rawls, H.R.- Effect of poling conditions on growth of calcium phosphate crystal in ferroelectric BaTiO₃ ceramics. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* (2002) 13(1):133:138.
- [33]- Jeong, J. H.; I. J. Kwak; H. I. Kim; J. L. Ong; H. R. Rawls; Y. J. Park.- Growth of calcium phosphate on poling treated ferroelectric BaTiO₃ ceramics. *Biomaterials* (2002) 23:3859–3864.
- [34]- Li, Z.; Y. Qu; X. Zhang; B. Yang.- Bioactive nano titania ceramics with biomechanical compatibility prepared by doping with piezoelectric BaTiO₃. *Acta Biomater.* (2009) 5(6):2189-2195.
- [35]- Feng, J.; Yuan, H. P.; Zhang, X. D.- Promotion of osteogenesis by a piezoelectric biological ceramic. *Biomaterials* (1997) 18(23):1531-1534.
- [36]- Baxter, F. R.; I. G. Turner; C. R. Bowen; J. P. Gittings; J. B. Chaudhuri.- An in vitro study of electrically active hydroxyapatite barium titanate ceramics using Saos 2 cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* (2009) 20(8):1697-1708.
- [37]- Nakamura, M.; Sekijima, Y.; Nakamura, S.; Kobayashi, T.; Niwa, K.; Yamashita, K.- Role of blood coagulation components as intermediators of high osteoconductivity of electrically polarized hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* (2006) 79A(3):627-634.
- [38]- Kobayashi, T.; Itoh, S.; Nakamura, S.; Nakamura, M.; Shinomiya, K.; Yamashita, K.- Enhanced bone bonding of hydroxyapatite coated titanium implants by electrical polarization. *J. Biomed. Mater. Res.* (2007) 82A(1):145151.
- [39]- Nakamura, S.; Kobayashi, T.; Nakamura, M.; Itoh, S.; Yamashita, K.- Electrostatic surface charge acceleration of bone ingrowth of porous hydroxyapatite/beta tricalcium phosphate ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* (2009) 92A(1):267-275.

- [40]- Wang, W.; Itoh, S.; Tanaka, Y.; Nagai, A.; Yamashita, K.- Comparison of enhancement of bone ingrowth into hydroxyapatite ceramics with highly and poorly interconnected pores by electrical polarization. *Acta Biomater.* (2009) 5(8):3132-3140.
- [41]- Park, J. B.; F. von Recum, A.; Kenner, G. H.; Kelly, B. J.; Coffeen, W. W.; Grether, M. F.- Piezoelectric ceramic implants: a feasibility study. *J. Biomed. Mater. Res.* (1980) 14(3): 269-277.
- [42]- Park, J. B.; F. von Recum, A.; Kenner, G. H.; Kelly, B. J.; Coffeen, W. W.; Grether, M. F.- Piezoelectric ceramic implants: in vivo results. *J. Biomed. Mater. Res.* (1981) 15(1):103-110.
- [43]- Takadama H; Kim HM; Kokubo T; Nakamura T.- Mechanism of biomineralization of apatite on a sodium silicate glass: TEM- EDX study in vitro. *Chem Mater* (2001) 13:1108-13.
- [44]- Kim, H. M.; Himeno, T.; Kokubo, T.; Nakamura, T.- Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid. *Biomaterials* (2005) 26:4366-4373.
- [47]- Pierre C. Alain.- Introduction to sol-gel processing. Kluwer Academic Publishers. (1998)
- [45]- Feng, Wang; Mu-sen, Li; Yu-peng, Lu; Yong-xin, Qi.- A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders. *Materials Letters* (2005) 59,59: 916-919.
- [46]- Fathi, M. H.; Hanifi, A.- Evaluation and Characterization of Nanostructure Hydroxyapatite Powder Prepared by Simple Sol-Gel Method. *Materials Letters* (2007) 61: 3978-3983.
- [48]- Franco, P. (2009). Produção de Fibras de Hidroxiapatite por Electrofiação - Tese de Mestrado em Biotecnologia. Lisboa: FCT/UNL.
- [49]- <http://www.chemat.com/chemattechnology/RD.aspx>, consultado a 06/07/2012
- [50]- Brinker, C.; Scherer, George.- Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing. s.l. : Academic press, inc, (1990).
- [51]- Pedrosa, Ana. (2011). Influência da Polarização Eléctrica no Crescimento de Hidroxiapatite para Implantes Ósseos- Tese de Mestrado em Engenharia Biomédica: Lisboa: FCT/UNL.
- [52]- Trombina et al. - Otimização dos processos de moagem e secagem do pó de alumina/TiC obtido por moagem reactiva. *Cerâmica* (2011) 57:416-421.
- [53]- Claro, Ana (2009)- Estudo dos efeitos da irradiação ultra-sónica na inibição do crescimento de cianobactérias do género *Microcystis* spp – Tese de Mestrado em Ambiente. Lisboa: FCT/UNL
- [54]- <http://www.hielscher.com/pt/technolo.htm> consultado no dia 09/07/2012

- [55]- Amelinckx, S. et. al.- Electron Microscopy: Principles and Fundamentals. VCH, capítulo 2. (1997)
- [56]- Rocha, F.R.P.; Teixeira, L.S.G.- Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Quím. Nova.* (2004) 27(5):807-12.
- [57]- Skoog, et al.- Principles of Instrumental Analysis. 6th ed. Thomson Brooks/Cole. (2007) 169-173.
- [58] - Joana, Pereira. (2010). Estudo do comportamento de nanopartículas de dióxido de titânio em diferentes suspensões - Tese de Mestrado em Materiais. Lisboa: FCT/UNL.
- [59]-Kremer, F.; Schonhals, A.- Broadband Dielectric Spectroscopy. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. (2002).
- [60]- Y.W.Gu; K.A. Khor; P.Cheang.- In vitro studies of plasma-sprayed hydroxyapatite/Ti-6^a1-4V composite coating in simulated body fluid (SBF). *Biomaterials* (2003) 24:1603-1611.
- [61]- Kokubo, T.; Ito S; Huang, ZT.; Hayashi, T.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T.- Ca,P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. *J. Biomed. Mater. Res.* (1990) 24:331-43.
- [62]- A. Cuneit Tas - Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids. *Biomaterials* 21 (2000) 1429-1438
- [63]- Defne. Bayraktar; A. Cuneit Tas - Chemical Preparation of Carbonated Calcium Hydroxyapatite Powders at 37°C in Urea-containing Synthetic Body Fluids. *J. Eur. Ceram. Soc.* 19 (1999) 2573-2579
- [64] - Jalota, S.; Bhaduri, S.B.; Tas, A.C.- *Using a synthetic body fluid (SBF) solution of 27 mM HCO₃⁻ to make bone substitutes more osteointegrative. Material Science and Engineering C* (2008) 28(1): 129-40.
- [65]- Weng, W.; Baptista, J. L.- Sol-Gel Derived Porous Hydroxyapatite Coatings. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (1998) 9:159-163.
- [66]- Weng, W.; Baptista, J. L.- Preparation and Characterization of Hydroxyapatite Coatings on Ti6Al4V Alloy by a Sol-Gel Method. *Journal of the American Ceramic Society* (1999) 82: 27-32.
- [67]-Kim, Il-Seok.; Kumta, Prashant- Sol-gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder. *Materials science and engineering B.* (2004) 111,(2,3): 232-236.
- [68]- Fathi, M.H.; Hanifia, A.; Mortazavi, V.- Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder. *Journal of materials processing technology* (2008) 202:536-542.

- [69]- Brito, S.L.M.; Gouveia, D.- Surface characterization of BaTiO₃ nanoparticles prepared by the polymeric precursor method. *Cerâmica* (2010) 56: 228-236.
- [70]- López, Maria; Fourlaris, Georgios; Rand, Brian; Riley, Frank.- Characterization of Barium Titanate Powders: Barium Carbonate Identification. *J.Am.Ceram. Soc.* (1999) 82(7): 1777-17786.
- [71] – Th. Leventouri; A. Antonakos; A. Kyriacou; R. Venturelli; E. Liarokapis; V. Perdikatsis - Crystal Structure Studies of Human Dental Apatite as a Function of Age. *International Journal of Biomaterials* (2009).
- [72]-J. Barralet, S. Best; Bonfield, W.- Carbonate substitution in precipitated hydroxyapatite: An investigation into the effects of reaction temperature and bicarbonate ion concentration. *Journal of Biomedical Materials Research* (1998) 41(1):79–86.
- [73]- Neagu, E. R.- Thermally Stimulated Discharge Current: A Method to Study the Molecular Movements in Dielectric Materials. (2010) Conference presented in CENIMAT/I3N.
- [74]- Dias, C. J. (2009). Impedance Spectroscopy Module.